

Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération

Centre
de
Montpellier

H2 64020
2^e Bd
non numérisé

ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE
DE TRYPANOSOMA
(*SCHIZOTRYPANUM*) *CRUZI*
EN GUYANE FRANÇAISE

Katarzyna LEWICKA

Document ORSTOM Montpellier, 1994, n° 4

Katarzyna LEWICKA

ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE
DE TRYPANOSOMA
(SCHIZOTRYPANUM) CRUZI
EN GUYANE FRANÇAISE

Ré-édition à l'identique du Doc. O.M.P. 1991. n° 8

Ø52
GLOTRY
LEW

Montpellier ORSTOM 1994

F 35349-ex.2

Les opinions exprimées dans ce document
n'engagent que la responsabilité de leurs auteurs

Ce travail de recherche a été effectué au sein du Laboratoire de génétique des parasites et des vecteurs (U.R. Trypanosomoses et Leishmanioses; département Eau et Santé) du centre de recherche Orstom de Montpellier sous la direction du Dr Frédérique Brénière et du Dr Michel Tibayrenc, directeur de l'unité, pour l'obtention par Katarzyna Lewicka du Diplôme d'Études Approfondies de Parasitologie de l'Université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier II, le 1^{er} octobre 1991.

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Introduction	1
<u>I. La maladie de Chagas</u>	1
<u>1. Le parasite</u>	1
1.1. Position taxonomique du genre <i>Trypanosoma</i>	1
1.2. Morphologie et cycle évolutif	1
1.3. Ploidie et mode de reproduction	2
<u>2. Les vecteurs</u>	2
<u>3. Les réservoirs</u>	3
<u>4. Aspects pathologiques</u>	3
<u>II. Diversité génétique de <i>Trypanosoma cruzi</i></u>	3
<u>1. Analyse isoenzymatique</u>	3
<u>2. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction</u>	4
<u>III. La situation en Guyane française</u>	4
Matériels et méthodes	5
<u>I. Préparation des échantillons</u>	5
<u>1. Hôtes et origine géographique des stocks étudiés</u>	5
<u>2. Cultures et extraits enzymatiques</u>	7
<u>II. Electrophorèse</u>	7
<u>1. Choix du support</u>	7

<u>2. Protocoles de migration et de révélation</u>	7
<u>III. Méthodes d'interprétation des résultats</u>	9
<u>1. Analyse des profils enzymatiques</u>	9
<u>2. Analyse de la diversité des zymodèmes multilocus</u>	10
<u>3. Analyse phylogénique</u>	10
3.1. Etude des matrices de distances	10
3.1.1. Distances de Jaccard	10
3.1.2. Distances génétiques standard de Nei	10
3.2. Analyse de dendrogrammes	11
<u>4. Analyses statistiques du mode de reproduction du parasite dans les conditions naturelles</u>	11
4.1. Tests de déséquilibre de liaison avec ploïdie quelconque	12
4.2. Test "FACTO"	13
4.3. Tests "HAPLO"	13
Résultats et Discussion.	14
<u>I. Analyse des profils enzymatiques observés</u>	14
<u>1. Interprétation allélique (génotypique)</u>	14
<u>2. Interprétation phénotypique</u>	16
<u>II. Analyse de la variabilité génétique</u>	16
<u>1. La diversité des zymodèmes multilocus</u>	16
<u>2. Analyse phylogénique</u>	17
2.1. Etude des matrices de distances	17
2.1.1. Distances de Jaccard	17
2.1.2. Distances génétiques standards de Nei	18
2.1.3. Conclusions	19

2.2. Analyse de dendrogrammes	20
<u>3. Analyses statistiques du mode de reproduction du parasite</u>	21
3.1. Tests de ségrégation allélique intralocus	21
3.2. Tests de recombinaison interloci	22
3.2.1. Déséquilibre de liaison	22
3.2.2. Test de recombinaison FACTO	23
3.2.3. Tests de recombinaison HAPLO	23
Conclusions	26
Bibliographie	28
Annexes	

Résumé

Par électrophorèse sur acétate de cellulose, nous avons analysé la variabilité isoenzymatique de 28 stocks de *Trypanosomatidae* originaires de Guyane française pour 22 loci génétiques. La majorité des stocks se rattache au taxon *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), tandis que le statut spécifique de trois d'entre eux reste indéterminé. La diversité génétique de l'espèce *T. cruzi* dans cette zone géographique, telle qu'on peut la mesurer par un certain nombre d'indices de distances, est forte, mais recoupe les résultats antérieurs. L'analyse de génétique des populations montre une structure typiquement clonale, ce qui confirme pour ces cycles sylvestres les résultats observés dans d'autres écosystèmes. Cependant une diversité génotypique importante est ici compatible avec l'hypothèse que des échanges génétiques occasionnels modulent à l'échelle évolutive la structure clonale prépondérante. La répartition des zymodèmes, assimilables ici à des clones naturels, permet de proposer certaines hypothèses sur les interfaces cycle sylvestre-cycle domestique.

Summary

By cellulose acetate electrophoresis, we have analyzed the isozyme variability of 28 *Trypanosomatidae* stocks from French Guiana at 22 genetic loci. Most part of these stocks belong to the taxon *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), while the specific status of 3 of them remains undetermined. Genetic diversity of the species *T. cruzi* in the geographical area under survey, as estimated by some distance indices, is considerable, but consistent with previous results. Population genetics analysis shows a typical clonal structure, which confirms, in these selvatic cycles, results observed in other ecosystems. Nevertheless, a high genotype diversity is here consistent with the hypothesis that occasional mating could interfere with the basically clonal structure on an evolutionary scale. Repartition of the zymodemes (here equatable to natural clones), make it possible to propose some hypotheses on overlap between selvatic and domestic cycles.

Introduction

Découvert par Carlos Chagas en 1909, *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* est l'agent de la maladie de Chagas ou trypanosomiase humaine latino-américaine. Cette anthroponose touche actuellement 16 à 18 millions de personnes (données officielles, Organisation Mondiale de la Santé). 500 mille personnes par an, surtout des enfants, sont nouvellement infectées et 90 millions de personnes constituent un groupe à risque (1).

Présente à l'état endémique sur tout le continent Latino-Américain, du Mexique à l'Argentine, dans des faciès géographiques et climatologiques très diversifiés, c'est une maladie touchant aussi bien les zones rurales que les quartiers défavorisés des villes. Certaines espèces de vecteurs sont presque exclusivement domestiques comme *Triatoma infestans*, qui est extrêmement répandu en Amérique du Sud. D'autres sont sylvestres, mais on peut noter dernièrement l'apparition de ces espèces en zones domestiques. La connaissance des cycles sylvestres est donc très importante pour une évaluation rigoureuse des risques épidémiologiques possibles des populations en contact avec ces cycles (zones de forêt).

I. La maladie de Chagas

1. Le parasite

1.1. Position taxonomique du genre *Trypanosoma* (Grüby, 1843)

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi est un protozoaire appartenant à la famille des *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901), dont les deux caractéristiques principales sont la présence d'un flagelle locomoteur, rattaché à la paroi du corps par une membrane ondulante, et d'un kinétoplaste, sorte de mitochondrie géante, constituée d'un ADN (acide desoxyribonucléique) extranucléaire: l'ADN kinétoplastique ou kDNA.

1.2. Morphologie et cycle évolutif

Durant son cycle évolutif, *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) présente différentes formes dont les trois principales sont:

- la forme trypomastigote, extracellulaire, circulant dans le sang des hôtes mammifères et présente dans le tube digestif postérieur de l'insecte vecteur;
- la forme amastigote, intracellulaire, forme de multiplication chez l'hôte mammifère, infecte les cellules réticulo-histiocytaires et musculaires;

- la forme épimastigote, forme de multiplication, se limite au tube digestif de l'insecte vecteur. C'est cette forme qui est observée dans les cultures *in vitro* en milieu semi-défini: le présent travail a pris pour matériel d'étude de telles formes épimastigotes.

A partir des déjections de l'insecte déposées sur la peau, les formes trypomastigotes infectantes pénètrent activement dans leur hôte (homme, mammifères sauvages et domestiques) à la faveur d'une excoriation ou à travers une muqueuse saine. Elles traversent la membrane des macrophages au niveau du derme et du tissu sous-cutané. A l'intérieur de ces cellules elles perdent leur flagelle (forme amastigote) et se multiplient par division binaire pendant quelques jours. Les amastigotes se transforment alors en trypomastigotes, la cellule-hôte se rompt et d'autres macrophages, puis des cellules musculaires et réticulo-histiocytaires, seront infectés.

1.3. Ploidie et mode de reproduction

De nombreuses études réalisées sur la variabilité génétique de *T. cruzi* (voir § II) suggèrent que cet organisme est diploïde (2,3,4,5). Par ailleurs, son mode de reproduction est essentiellement clonal dans la nature, bien qu'il pourrait exister une reproduction sexuée occasionnelle, jusqu'à présent non mise en évidence (4,6). L'étude du mode de reproduction des parasites dans les conditions naturelles a une portée médicale considérable: en présence de structure clonale stable dans l'espace et le temps, les notions d'espèces et de sous-espèces n'ont aucune définition rigoureuse. Le clone naturel représente alors l'unité taxonomique utile à considérer pour toutes études appliquées (épidémiologiques, immunologiques, pharmacologiques *etc...*)(6,7).

2. Les vecteurs

Plus de 66 espèces d'Hétéroptères ont été trouvées naturellement infectées par *T. cruzi* (8). Elles appartiennent à la famille des *Reduviidae*, les trois genres les plus représentés sont *Triatoma*, *Panstrongylus* et *Rhodnius*. Les vecteurs sont hématophages à tous les stades de leur développement quel que soit leur sexe. L'efficacité vectrice varie selon les espèces et pourrait également dépendre des clones de *T. cruzi* impliqués. A part la transmission classique par insecte vecteur, d'autres modes sont possibles: transfusion sanguine, passage transplacentaire, greffe d'organes, accident de laboratoire.

3. Les réservoirs

Le réservoir animal est très vaste. Il comprend aussi bien des mammifères sauvages (rongeurs, sarigues, tatous, singes), que des animaux domestiques (chien, chat, cobaye, et en fait, potentiellement, tous mammifères domestiques).

4. Aspects pathologiques

La phase aiguë de la maladie de Chagas se manifeste essentiellement chez les enfants. Elle s'accompagne le plus souvent d'une symptomatologie vague et peu caractéristique. Environ 10% des cas connaissent une évolution spontanément létale.

Pendant plusieurs années les patients peuvent ne présenter aucune manifestation morbide. Environ 40% des personnes développent une pathologie 10 à 20 ans après le premier épisode aigu. La phase chronique se caractérise par une très faible parasitémie et des lésions tissulaires chroniques. Les manifestations chroniques sont le plus souvent cardiaques et digestives (développement de mégaorganes, essentiellement mégacolon et mégacœsophage).

L'hypothèse d'une spécificité pathologique des zymodèmes (ou clones naturels) de *T. cruzi* a été proposée (9,10,11).

II. Diversité génétique de *Trypanosoma cruzi*

1. Analyse isoenzymatique

Depuis de nombreuses années, l'analyse isoenzymatique a été développée pour l'étude de génétique des populations naturelles (12,13,14)

La variabilité isoenzymatique de *T. cruzi* a été montrée dès 1974 par Toyé (15). Miles *et al.* (16,17,18) distinguent trois groupes isoenzymatiques principaux ou zymodèmes, appelés Z1, Z2 et Z3, après interprétation phénétique des zymogrammes. Des études isoenzymatiques extensives menées dès 1980 par Tibayrenc *et al.* ont montré que les populations naturelles de *Trypanosoma cruzi* présentent une structure principalement clonale (4,6). Les arguments en faveur de cette hypothèse sont :

- L'absence de ségrégation entre allèles à un locus donné. En effet on observe une sur- ou une sous-représentation de certains génotypes ségrégeants, incompatible avec

les fréquences alléliques relevées. Un cas particulier est l'hétérozygotie fixée (à un locus donné, un ou plusieurs génotypes hétérozygotes sont en très fort excès, ou même exclusivement représentés).

- L'absence de recombinaison entre génotypes de loci différents, qui se traduit par la présence de génotypes multilocus ubiquistes et hyperreprésentés (dont le nombre est supérieur à celui du nombre de génotypes attendus sous l'hypothèse de recombinaison libre) et par un fort déséquilibre de liaison (19).

L'interprétation de la variabilité génétique de *Trypanosoma cruzi* en termes de génétique des populations suggère donc l'existence de clones stables dans l'espace et dans le temps et même à l'échelle évolutive. Avec des arguments similaires, cette hypothèse a été récemment étendue à d'autres protozoaires parasites, ainsi qu'à certains champignons et levures unicellulaires (7,10).

2. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

Par cette technique, l'ADN kinétoplastique se révèle hautement polymorphe (21): les différents profils individualisés sont nommés schizodèmes. La variabilité des schizodèmes est statistiquement corrélée à celle des zymodèmes (22). La corrélation statistique entre des séries indépendantes de marqueurs génétiques est un argument classique en faveur d'une structure clonale (4,7,23,24).

III. La situation en Guyane française

En Guyane française, un seul cas autochtone de maladie de Chagas a été signalé. Cependant la prévalence d'infection est élevée chez différentes espèces de mammifères sauvages : 30,8% pour *Didelphis marsupialis* et 8,1% pour *Philander opossum* (25). L'importance de la zoonose et l'installation d'animaux sauvages dans les villages forestiers, tels que Cacao, rendent probables l'existence d'un cycle péri-domestique de la maladie de Chagas.

Le vecteur domestique majeur semble être *Rhodnius prolixus*, espèce très bien adaptée à l'habitation humaine, mais qui garde de nombreux foyers sylvatiques. Dans le cycle sylvatique, *Panstrongylus geniculatus* paraît le plus répandu. Mais il peut également être associé à l'apparition de cycles péri-domestiques (25).

L'analyse isoenzymatique de quelques stocks isolés en divers points de la Guyane montre qu'ils sont génétiquement apparentés au zymodème 1 de Miles (25). Notre étude porte sur un plus grand nombre de stocks et de systèmes enzymatiques (3). Elle incorpore par ailleurs de nouveaux tests statistiques de génétique des populations (7,20), conçus spécialement pour tester l'hypothèse de reproduction clonale dans les populations naturelles. Nous considérerons dans notre travail les points suivants:

- Quelle est la variabilité géographique du parasite dans cette zone géographique?
- L'hypothèse clonale chez *T. cruzi* a été surtout basée sur l'étude des stocks isolés en cycle domestique. Or il a été supposé qu'un éventuel cycle sexué serait plus probablement retrouvé dans l'habitat originel du parasite, c'est-à-dire en cycle sylvestre (4): l'étude de tels cycles en Guyane française apporte-t-elle l'indication d'un tel cycle sexué "fossile"?
- La structuration populationnelle du parasite dans cette zone géographique apporte-t-elle des informations épidémiologiques (communication entre réservoirs, entre localités)?

Matériels et méthodes

I. Préparation des échantillons

1. Hôtes et origine géographique des stocks étudiés

L'ensemble des stocks nous a été communiqué par le Docteur J.P. Dedet, de l'Institut Pasteur de Cayenne (Guyane française). Les hôtes et l'origine géographique des 28 stocks étudiés sont précisés sur le tableau I. Ils ont été obtenus :

- du tube digestif d'insectes vecteurs (21), capturés dans 10 sites de forêt primaire ou dans des habitations (agglomération de Cayenne et Montjoly)
- de mammifères sauvages (prélèvements effectués à partir de la peau ou des organes profonds), capturés dans les quatre sites principaux suivants (25) (figure 1):

- Station FRG, Montsinéry: zone de forêt primaire située à une trentaine de kilomètres à l'ouest de Cayenne;

- Paramana: zone de forêt secondaire fortement remaniée par l'homme à une vingtaine de kilomètres de Cayenne;



Figure 1: Origine géographique des stocks de *Trypanosoma cruzi* étudiés (carte de la Guyane française au 1: 4350000)

SOUCHES	HOTE	LOCALITE	DATE	ZYMODEME
A0007	<i>Didelphis marsupialis</i>	Paramana	1981	
A0055	<i>Philander opossum</i>	FRG	1982	
A0080	<i>Didelphis marsupialis</i>	FRG	1982	
A0083	<i>Didelphis marsupialis</i>	FRG	1982	
A0087	<i>Didelphis marsupialis</i>	FRG	1982	
A0092	<i>Didelphis marsupialis</i>	Acarouany	1982	
A0096	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao	1983	
A0098	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao	1983	
A0099	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao	1983	
A0102	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao	1983	
A0105	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao	1983	
A0117	<i>Didelphis marsupialis</i>	FRG	1983	
A0147	<i>Philander opossum</i>	Nancibo	1984	
A0262	<i>Didelphis marsupialis</i>	FRG	1986	
A0268	<i>Philander opossum</i>	Cacao	1986	
A0269	<i>Philander opossum</i>	Cacao	1986	
A0276	<i>Saimiri sciureus</i>	Cacao	1986	
A0286	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao	1987	
A0290	<i>Didelphis marsupialis</i>	Cacao	1987	
R0107	<i>Rhodnius prolixus</i>	Montjoly	1983	
R0112	<i>Rhodnius prolixus</i>	Montjoly	1983	
R0143	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Kaw	1984	
R0145	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	FRG	1984	
R0150	<i>Rhodnius pictipes</i>	Cayenne	1984	
R0173	<i>Rhodnius pictipes</i>	St George	1984	
R0174	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Montjoly	1984	
R0177	<i>Panstrongylus geniculatus</i>	Montjoly	1984	
R0203	<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>	Regina	1985	
CanIII cl1 Z3*	Homme	Belém (Brésil)		27**
SC43 cl2*	<i>Triatoma infestans</i>	Santa Cruz (Bolivie)	1981	39**
Teh clone1*	<i>Triatominae</i>	Mexico		12**
Tula FKIIA*	Homme	Chili		43**

* Isolats clonés en laboratoire

** Numérotation selon (4)

Tableau I: Stocks de *Trypanosoma cruzi* utilisés dans notre étude

- Acarouany: zone de forêt primaire en bordure d'une vaste aire de déforestation entourant elle-même un village d'agriculteurs H'mongs (réfugiés des hauts plateaux laotiens);
- Cacao: second village d'agriculteurs H'mongs, à la limite de la forêt, en bordure d'une vaste zone de déforestation.

2. Cultures et extraits enzymatiques

L'isolement des stocks s'effectue en milieu NNN; la production en masse des parasites en milieu LIT. La préparation des culots parasitaires pour l'analyse électrophorétique est effectuée selon Tibayrenc *et al.* (3): les culots parasitaires sont décongelés sur glace, suspendus dans un volume de stabilisateur d'enzymes (27) correspondant au poids du culot (1 μ l de stabilisateur par mg de culot), puis laissés pendant 20 minutes dans la glace pour faire éclater les cellules. Après centrifugation, le surnageant contenant les enzymes est aliquoté.

II. Electrophorèse

1. Choix du support

Les électrophorèses sont pratiquées sur des plaques d'acétate de cellulose (Helena[®] laboratories, Beaumont, Texas, USA), sur lesquelles la vitesse de migration dépend uniquement de la charge protéique globale.

2. Protocoles de migration et de révélation

Les plaques sont imbibées pendant 20 minutes dans le tampon d'électrophorèse, dont la dilution dépend du système enzymatique étudié (annexe I). Toutes conditions égales par ailleurs, plus le tampon d'imbibition est dilué par rapport au tampon de migration, mieux les bandes isoenzymatiques sont séparées (28), mais moins elles sont nettes. Après imbibition, les plaques sont séchées sur du papier absorbant.

Les extraits de protéines sont déposés dans un support comportant 12 puits, dont trois vont contenir les stocks de référence suivants (tous clonés en laboratoire): Tehuntepec clone 1 (génotype n°12) en position 4 et 12; SC43 clone 2 (génotype n°39) en 9. Pour certaines enzymes d'autres stocks de référence ont été utilisées: Tulahuen FKIIA (génotype n°43), Can III clone 1 Z3 (génotype n°27) (voir tableau I). La numérotation des génotypes correspond à celle des clones naturels décrits par Tibayrenc et Ayala (4). Pour l'analyse des profils enzymatiques de la *MDH*, nous avons également utilisé comme

référence les stocks Y et PB3 , soit les génotypes 34 et 25, seuls génotypes pour lesquels on avait observé une variabilité à ce locus. Le dépôt sur la plaque d'acétate se fait grâce à un peigne spécial (laboratoires Helena®).

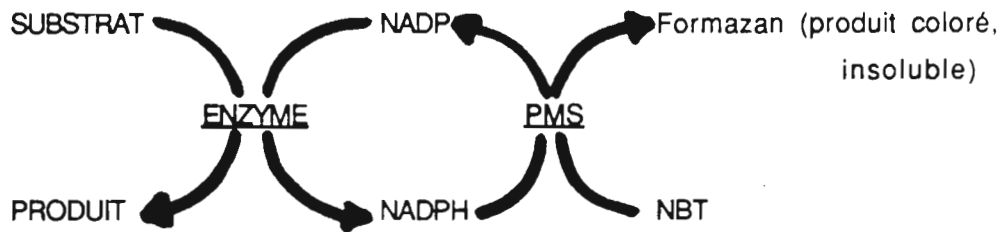
Les plaques sont déposées dans les cuves d'électrophorèse contenant le tampon de migration, face plastique vers le haut, la zone de dépôt étant orientée du côté cathodique (sauf pour la *SOD*, pour laquelle le dépôt est central). L'ensemble est refermé et mis sous tension; le voltage appliqué et le temps de migration dépendent du système enzymatique étudié (annexe I). Pour les systèmes nécessitant une réfrigération, une boîte de Pétri contenant de la glace est posée sur le couvercle de la cuve.

23 systèmes enzymatiques ont été testés: *6PG*, *ACON*, *ALAT*, *AK*, *DIA*, *EST*, *FK*, *GAPD*, *G6PD*, *GDH*, *GOT*, *GPI*, *GSR*, *HK*, *IDH*, *LAP*, *MDH*, *ME*, *PEP 1 et 2*, *PGM*, *PK* et *SOD*.

ABREVIATION	NOM	CODE
6PG	6 Phosphogluconate déhydrogénase	E.C.1.1.1.44.
ACON	Aconitase	E.C.4.2.1.3.
AK	Adenylate kinase	E.C. 2.7.4.3.
ALAT	Alanine aminotransférase	E.C.2.6.1.2.
DIA	Diaphorase	E.C.1.6.*.*.
EST	Esterase	E.C.3.1.1.1.
FK	Fructokinase	E.C.2.7.1.4.
G6PD	Glucose-6-phosphate déhydrogénase	E.C.1.1.1.49.
GAPD	Glyceraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase	E.C.1.2.1.12.
GDH	Glutamate déhydrogénase (NAD/NADP)	E.C.1.(2/4).1.
GOT	Aspartate aminotransférase	E.C.2.6.1.1.
GPI	Glucose phosphate isomérase	E.C.5.3.1.9.
GSR	Glutathione reductase	E.C.1.6.4.2.
HK	Hexokinase	E.C.2.7.1.1.
IDH	Isocitrate déhydrogénase	E.C.1.1.1.42.
LAP	Leucine amino peptidase	E.C.3.4.11.1.
MDH	Malate déhydrogénase	E.C.1.1.1.37.
ME	Malic enzyme	E.C.1.1.1.40.
MPI	Mannose phosphate isomérase	E.C.5.3.1.8.
PEP 1, 2	Peptidases 1 et 2	E.C.3.4.11.*.
PGM	Phosphoglucomutase	E.C.2.7.5.1.
PK	Pyruvate kinase	E.C.2.7.1.40.
SOD	Superoxide dismutase	E.C.1.15.1.1.

Les solutions de révélation spécifiques des différents systèmes enzymatiques sont préparées d'après les recettes données en annexe II (inspirées de **3,29,30,31,32**, avec certaines modifications). Dix ml de solution d'agarose 1,2%, préparée à l'avance par ébullition et maintenue à 60°C, sont ajoutés aux 10 ml de solution de coloration spécifique. Le gel ainsi préparé est coulé dans une boîte de Pétri et placé immédiatement à l'obscurité.

Après l'électrophorèse, les plaques d'acétate sont déposées sur les gels de révélation. La réaction enzymatique aura lieu à l'endroit de la plaque où a migré l'enzyme selon la réaction:



La révélation se fait à l'étuve à 37°C, jusqu'à apparition de bandes colorées (ou fluorescentes). Dans le cas de la *SOD*, le gel est placé 10 minutes à l'obscurité, puis transféré sur transilluminateur. Pour tous les systèmes, la réaction est arrêtée en trempant la plaque dans une solution d'acide acétique 5% pendant 5 à 10 minutes. La plaque est ensuite rincée à l'eau et séchée à température ambiante.

III. Méthodes d'interprétation des résultats

1. Analyse des profils enzymatiques

Les électromorphes observés sur les plaques d'acétate de cellulose seront interprétés de deux manières :

- Interprétation génotypique directe: les bandes observées pour chaque locus sont assimilées à des allèles quand cette interprétation est possible. L'hypothèse de base est celle de la diploïdie (2,5,22). Les allèles sont numérotées de 1 à n, suivant leur vitesse de migration (du plus rapide au plus lent).

- Interprétation phénétique: les bandes observées pour chaque système enzymatique sont numérotées de 1 à n, suivant leur vitesse de migration (du plus rapide au plus lent).

Nous évaluerons (33):

- l'hétérozygotie moyenne observée H_o : $H_o = h_o / (N \cdot r)$

avec h_o - nombre de génotypes hétérozygotes dans l'échantillon; N - nombre d'isolats; r - nombre de loci testés.

- l'hétérozygotie théorique (diversité génétique moyenne) H :

$$H = \sum_1^r h / r \qquad h = 1 - \sum_1^i q_i^2$$

avec h - diversité génétique à chaque locus; q_i - fréquence du $i^{\text{ème}}$ allèle du gène à ce locus;
 r - nombre de loci testés.

2. Analyse de la diversité des zymodèmes multilocus

Elle peut être mesurée par l'indice de diversité clonale (34):

$$d = n (1 - \sum x_i^2) / (n-1)$$

avec n - nombre d'isolats; x_i - abondance relative du $i^{\text{ème}}$ type électrophorétique (*i.e.* zymodème) parmi les isolats.

3. Analyse phylogénique

3.1. Etude des matrices de distances

3.1.1. Distances de Jaccard (35)

Elle permet de quantifier la dissemblance phénétique entre deux zymodèmes . Elle est calculée selon la formule:

$$D_j = 1 - C / 2N - C$$

avec C - nombre de bandes communes aux deux zymodèmes; N - nombre total de bandes révélées.

Une deuxième approche phénétique sera le calcul d'une distance appelée P_j , où chaque phénotype différent est individualisé, même s'il partage des bandes avec d'autres profils.

3.1.2. Distance génétique standard de Nei (36)

Elle a une signification génétique précise, car elle représente le nombre moyen de codons différents par gène entre deux populations. Largement employée dans la caractérisation d'organismes variés et en particulier d'un grand nombre de *Kinetoplastidae*, elle constitue une référence pour les études de phylogénie biochimique.

La matrice des distances génétiques D a été établie à l'aide des formules de Nei:

$$D_n = -\ln I \quad \text{avec} \quad I = (\sum x_i y_i) / \sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}$$

avec x_i et y_i - fréquences du $i^{\text{ème}}$ allèle pour les deux souches considérées.

3.2. Analyse de dendrogrammes

Les trois types de distances calculées (D_n , D_j , P_j) nous amèneront à la construction de dendrogrammes correspondants, images de classification hiérarchique, montrant les relations entre les différents zymodèmes (programme informatique communiqué par Serres et Roux; 37). Nous utiliserons la méthode d'agglomération par liens moyens, qui semble la plus parcimonieuse, car elle tient compte de l'ensemble des objets étudiés pour le calcul des distances à chaque agglomération. Ces dendrogrammes représentent avant tout une visualisation commode des matrices de distances, et ne doivent être considérés comme arbres phylogéniques qu'avec prudence.

4. Analyses statistiques du mode de reproduction du parasite dans les conditions naturelles

Le principe général des tests statistiques est basé sur l'hypothèse nulle d'une reproduction sexuée libre, permettant des échanges génétiques aléatoires entre populations, dans une aire géographique déterminée, ces populations ayant des fréquences génétiques connues. Aucune population n'est parfaitement panmictique, et la structuration géographique (fréquences alléliques différentes d'une localité à l'autre) génère en elle-même de "faux" déséquilibres de liaison ou de "fausses" déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, susceptibles d'entraîner des interprétations erronées. Cependant, il est en général possible de dépister de tels biaisages, et de départager dans un résultat statistique ce qui revient à une simple structuration géographique de ce qui est imputable au mode de reproduction lui-même de l'organisme étudié (20).

Nous avons appliqué deux séries de tests à notre échantillonnage. Les tests dits de ségrégation explorent le réassortiment des allèles à un locus donné. Les tests dits de recombinaison considèrent les réassociations des génotypes différents d'un locus à l'autre. Les premiers reposent sur l'approche statistique, dite loi de Hardy-Weinberg, tandis que les seconds sont fondés sur le phénomène biologique appelé déséquilibre de liaison. Les différents tests décrits dans (7) sont énumérés ci-après:

<u>Critère</u>	<u>Description</u>
Ségrégation (intralocus)	
a	Hétérozygotie fixée*
b	Absence ou déficit de génotypes ségrégeants*
c	Déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg
Recombinaison (interloci)	
d	Génotypes multilocus surreprésentés et ubiquistes* (tests statistiques d1 et d2)
e	Absence ou déficit de génotypes recombinants
f	Déséquilibre de liaison
g	Corrélation entre deux séries indépendantes de marqueurs génétiques

* = utilisés qualitativement sans calculs statistiques

"d1" est basé sur une analyse combinatoire, tandis que "d2", comme "e", font appel à une simulation de Monte Carlo.

Les tests de ségrégation requièrent une lecture allélique des zymogrammes, et reposent sur l'hypothèse de travail de la diploïdie chez *Trypanosoma cruzi* (2,3,4,5). Les tests de recombinaison sont utilisables quelque soit la ploïdie de l'organisme étudié, et même si l'interprétation allélique est impossible. Cela les rend très précieux dans l'étude des protozoaires parasites, dont la variabilité isoenzymatique est parfois malaisée à interpréter.

4.1. Tests de déséquilibre de liaison avec ploïdie quelconque (DE, "f")

Pour le réaliser nous codons ainsi le tableau de génotypes (tableau II) :

1 pour le génotype le plus représenté

0 pour les autres

Par une simulation de Monte Carlo, nous testons l'hypothèse nulle d'échanges génétiques aléatoires en Guyane française, en calculant la probabilité "p" d'obtenir un déséquilibre de liaison supérieur ou égal à celui constaté dans l'échantillon. Une association interlocus non aléatoire, ou déséquilibre de liaison, permet de rejeter l'hypothèse nulle.

4.2. Test FACTO (critère "d1")

Il explore la probabilité d'échantillonner tel génotype unilocus ou multilocus en tenant compte de sa fréquence théorique. Le test spécifique développé en (7) repose sur une analyse combinatoire dont la formule est:

$$P = \sum_{i=m}^n \frac{n! x^i (1-x)^{n-i}}{i! (n-i)!}$$

avec $i=mx$ - probabilité du génotype multilocus dans l'hypothèse de panmixie, estimée par le produit des fréquences observées des génotypes unilocus (ou, dans l'hypothèse de diploïdie, des fréquences théoriques des génotypes unilocus selon les fréquences alléliques observées); n - nombre d'individus échantillonnés; m - effectif observé du génotype multilocus.

Il est à noter que ce test est également utilisable pour calculer la probabilité d'un génotype unilocus: nous l'avons utilisé de cette manière dans le présent travail.

4.3. Tests HAPLO (critères "d2" et "e")

Ce test repose sur une simulation de Monte Carlo avec 10 000 tirages aléatoires testant l'hypothèse nulle de recombinaison aléatoire, en se basant sur les fréquences observées des génotypes unilocus. Comme pour le test FACTO, les fréquences attendues des génotypes multilocus sont alors le produit des fréquences observées des génotypes unilocus qui le composent. On calcule:

- la probabilité d'obtenir un génotype quelconque avec un effectif égal ou supérieur à celui du génotype le plus représenté: critère "d2";
- la probabilité d'obtenir un nombre de génotypes différents égal ou inférieur au nombre qui est effectivement observé: critère "e".

Il est à noter que ces trois tests (DE= test "classique" de déséquilibre de liaison, FACTO et HAPLO) explorent tous trois le même phénomène biologique: le déséquilibre de liaison ou association génotypique interloci non aléatoire. Ils ne sauraient pour autant être considérés comme redondants: l'un pourra être positif, alors que l'autre négatif, et inversement. Par exemple, même en cas de structure clonale, si la variabilité génétique est très forte, on pourra avoir autant de clones que d'individus: HAPLO sera alors pris en défaut, alors que DE sera encore capable de dépister les associations non aléatoires entre loci (cas de figure effectivement observé dans le présent travail).

De même, les tests de ségrégation explorent tous trois la réassociation libre des allèles à un locus donné. Le test statistique de Hardy-Weinberg (critère "c") n'est que la vérification statistique des deux premiers (critères "a" et "b"). Cependant, pas plus que les tests de recombinaison, ces tests ne doivent pas être considérés comme redondants, ils autorisent une interprétation qualitative des données, qui permet d'aller plus loin que le test statistique "brut" de Hardy-Weinberg. Ainsi, l'hétérozygotie fixée est souvent très frappante lors de la lecture des gels isoenzymatiques. C'est également le cas pour un déficit total d'hétérozygotes en situation sympatrique.

Résultats et Discussion.

I. Analyse des profils enzymatiques observés

Certains systèmes enzymatiques ont été écartés de l'analyse du fait de leur redondance. Ainsi les kinases, dont 4 ont été étudiées (*AK*, *FK*, *HK* et *PK*), ont une spécificité chevauchante et présentent des profils en partie ou entièrement identiques entre eux. Une seule de ces kinases a été retenue et interprétée phénétiquement: l'hexokinase. D'autre part l'étude de la *GSR* a également été abandonnée: cette enzyme présente le même profil enzymatique que la *DIA2* (NADPH-Diaphorase). Les activités spécifiques des deux diaphorases *DIA1* (NADH-diaphorase) et *DIA2* (NADPH-diaphorase) sont révélées sur une même plaque d'acétate de cellulose en mettant les deux coenzymes (NADH et NADPH); nous révélons alors un profil enzymatique appelé *DIA* (39), somme des profils de *DIA1* et *DIA2*.

Pour certains stocks, il a été impossible de mettre en évidence la moindre activité pour quelques systèmes enzymatiques. Dans ce cas ces profils ont été codés 99 (c'est-à-dire absence de données), afin de ne pas introduire de biais en inférant la présence d'allèles nuls (*i.e.* allèles dont le produit n'est pas révélable; 38).

1. Interprétation allélique (géotypique)

Les profils électrophorétiques de 14 systèmes enzymatiques ont été interprétés géotypiquement : *6PG*, *ACON*, *ALAT*, *EST*, *G6PD*, *GAPD*, *GDH*, *GPI*, *IDH*, *LAP*, *MDH*, *ME*, *MPI* et *PGM*, correspondant à 18 loci. Les géotypes sont donnés dans le tableau II.

	6PGD	ACON	ALAT1	ALAT2	DIA	EST2	G6PD	GAPD	GDH1	GDH2	GOT	GPI	HK	IDH	LAP	MDH	ME1	ME2	MPI	PEP	PGM	SOD
A0007	1,2	1,3	111	313	1,2,5,11	212	111	1,4	99	111	4	1,5	99	112	1,5	111	313	111	111	1,4,9	111	1,2,3,4,5,6,9,12
A0055	416	212	212	212	5,8	212	717	313	313	313	4	515	2,6,9	414	414	212	212	212	313	3,10	515	7,8,9,12
A0080	416	212	212	212	5,8	212	717	313	313	313	4	515	2,6,9	414	414	212	212	212	313	3,10	515	7,8,9,12
A0083	111	111	313	99	1,2,5,11	212	111	111	99	99	99	111	99	212	112	111	313	111	111	1,4,9	212	1,2,3,4,5,6,9,12
A0087	111	111	313	99	1,2,5,11	212	111	111	99	99	99	111	99	212	112	111	313	111	111	1,4,9	212	1,2,3,4,5,6,9,12
A0092	416	212	212	212	5,8	212	717	313	313	313	4	515	2,6,9	414	414	212	212	212	313	3,10	515	7,8,9,12
A0096	99	313	313	313	5,7	212	515	414	99	313	4	515	2,5,8	315	414	212	313	212	414	2,8	616	7,8,9,12
A0098	99	313	313	313	5,7	212	515	213	99	313	4	515	2,5,8	313	414	212	216	212	313	2,6	616	7,8,9,12
A0099	616	313	212	313	5,8	313	616	414	313	317	1,4	515	1,4,7	414	414	212	212	212	313	3,10	515	7,8,9,12
A0102	616	313	212	313	5,8	212	717	414	313	313	1,5	616	1,4,7	313	313	212	212	212	313	2,8	515	7,8,9,11,12
A0105	616	313	212	212	5,8	414	616	414	313	313	1,4	515	2,6,9	414	414	212	212	212	313	4,7	818	6,7,8,9,12
A0117	616	313	212	313	5,9	313	616	414	313	313	1,4	515	2,5,8	414	414	212	313	212	414	4,7	515	7,8,9,12
A0147	616	313	313	313	5,9	313	515	414	313	313	1,4	515	2,5,8	414	414	212	212	212	414	4,9	616	7,8,9,12
A0262	99	212	212	212	4,7	212	515	414	99	111	4	515	2,6,9	414	313	212	111	111	212	2	414	7,8,9,12
A0268	99	313	212	212	5,7	212	717	414	99	313	3	515	2,6,9	414	313	212	111	111	313	2,9	313	7,8,9,12
A0269	99	99	212	212	99	212	99	414	99	313	3	515	99	414	313	212	111	111	313	2,7	99	7,8,9,12
A0276	99	99	99	111	3	515	212	99	99	313	6	99	99	99	818	313	99	212	99	11,13	99	7,8,9,11,12
A0286	99	212	212	313	4,6	212	717	414	99	212	4	515	99	414	414	212	111	111	313	2,6,9	414	7,8,9,12
A0290	99	212	212	313	4,6	313	717	414	99	212	4	515	99	414	414	212	115	111	313	2,6	313	7,8,9,12
R0107	616	313	212	313	5,8	313	616	414	313	317	1,4	515	1,4,7	414	414	212	212	212	313	3,10	515	7,8,9,12
R0112	616	313	212	313	5,8	313	717	414	313	418	1,4	515	1,4,7	414	414	212	313	212	313	3,10	515	7,8,9,12
R0143	616	313	212	313	5,10	212	616	414	313	313	1,4	515	1,4,7	414	414	212	313	313	313	3,10	515	7,8,9,12
R0145	616	313	212	313	5,8	212	616	414	313	519	1,4	515	1,4,7	414	414	212	212	212	313	3,10	515	7,8,9,12
R0150	616	313	212	313	5,8	212	616	414	313	519	1,4	515	1,4,7	414	414	212	212	212	313	3,10	515	7,8,9,12
R0173	515	313	212	313	5,9	212	414	414	313	212	1,4	515	1,4,7	313	414	212	212	212	313	2,9	313	7,8,9,11,12
R0174	515	313	212	313	5,8	212	515	414	313	212	1,5	515	1,4,7	313	414	212	212	111	313	2,7	313	7,8,9,11,12
R0177	515	313	212	313	5,8	212	515	414	313	212	1,5	515	1,4,7	313	414	212	212	111	313	2,7	313	7,8,9,11,12
R0203	515	313	212	313	5,8	212	515	414	212	212	1,4	414	1,4,7	313	414	212	212	111	313	4,7	313	7,8,9,12
Teh	616	313	212	111	3,5,8	212	414	414	313	313	1,4	515	3,6,10	414	414	212	212	212	414	2,6	515	7,8,9,12
SC43	316	313	212	212	5,8	111	414	515	111	212	2	214	2,6,9	616	616	313	111	313	99	4,10	7110	7,8,10
Tula	316	414	212	313	5,9	212	313	99	212	515	99	314	3,6,10	616	616	212	111	313	313	4,9	6111	7,8,10
Can	717	99	212	313	99	99	818	99	212	616	2	414	99	616	717	212	212	111	99	7,12	919	99

Tableau II: Génotypes et phénotypes observés

Pour quatre enzymes: *ALAT*, *EST*, *GDH* et *ME*, les profils électrophorétiques permettent d'inférer dans chaque cas deux loci, appelés 1 pour celui dont la zone d'activité est la plus proche de l'anode, et 2 pour l'autre (figure 3). Les bandes correspondant au locus *EST1* n'étant pas reproductibles, elles n'ont pas été interprétées. La présence de deux loci pour l'enzyme malique (*ME*) semble intéresser un grand nombre de *Kinetoplastidae* (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Phytomonas*); l'un est sans doute codé par l'ADN nucléaire et l'autre par l'ADN mitochondrial (ou kinétoplastique dans le cas de *Kinetoplastidae*), comme c'est le cas général pour les eucaryotes (39).

ME1 montre des profils homozygotes et hétérozygotes caractéristiques d'une enzyme dimère chez un organisme diploïde (2,3,4) (figure 3). Il en est de même pour la *6PG*, la *GPI* (figure 2) et la *LAP*: pour ces systèmes, les hétérozygotes putatifs ont trois bandes également espacées entre elles, la bande centrale étant plus intensément révélée que les deux autres.

L'*IDH*, la *GDH1* (NAD-*GDH*), la *GAPD* et la *PGM* (2,3,4) seraient des enzymes monomères (les hétérozygotes présentent deux bandes).

Pour la *GDH2* nous avons observé des hétérozygotes à sept bandes (figure 4), image caractéristique d'une enzyme hexamère chez un organisme diploïde; de tels profils sont assez rares (4) mais semblent répandus en Guyane (tableau II).

L'*ACON*, l'*ALAT 1* et *2*, l'*EST2*, la *G6PD*, la *MDH*, la *ME2* et la *MPI* sont variables mais ne présentent pas d'hétérozygotes; nous ne pouvons donc pas présumer de la structure quaternaire des enzymes impliquées.

L'analyse génotypique de ces 14 systèmes enzymatiques correspondant à 17 loci révèle:

- un nombre moyen d'allèles par locus de 4,41 pour l'ensemble de l'échantillonnage de Guyane, et de 3 pour les stocks de Guyane considérés comme du "vrai *cruzi* ": la variabilité à chaque locus est forte;

- un taux d'hétérozygotie observée de 0,029 pour l'ensemble de l'échantillonnage de Guyane, qui devient égale à 0,035 si on ne considère que les stocks "vrai *cruzi* "; alors que le taux d'hétérozygotie théorique, calculé en fonction des fréquences alléliques observées sous l'hypothèse d'une reproduction mendélienne, est de 0,394 pour les stocks "vrai *cruzi*" de Guyane. La différence est grande et montre un déficit d'hétérozygotes compatible avec une entrave à la ségrégation. Ceci est confirmé par les calculs statistiques de la ségrégation (voir plus loin).

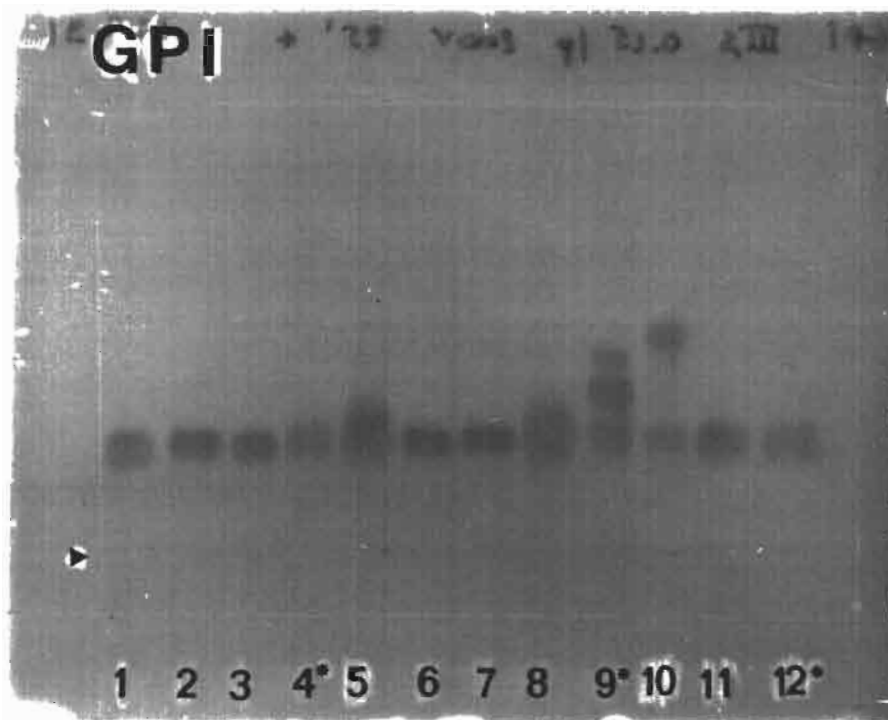


Figure 2: Profil électrophorétique de la Glucose phosphate isomérase (GPI). Les stocks de référence sont signalés par un astérisque: 4 et 12: Teh*, 9: SC43*; 1: A0102, 2: R0143, 3: R0107, 5: A0096, 6: R0112, 7: R0150, 8: A0098, 10: A0007, 11: R0145. La

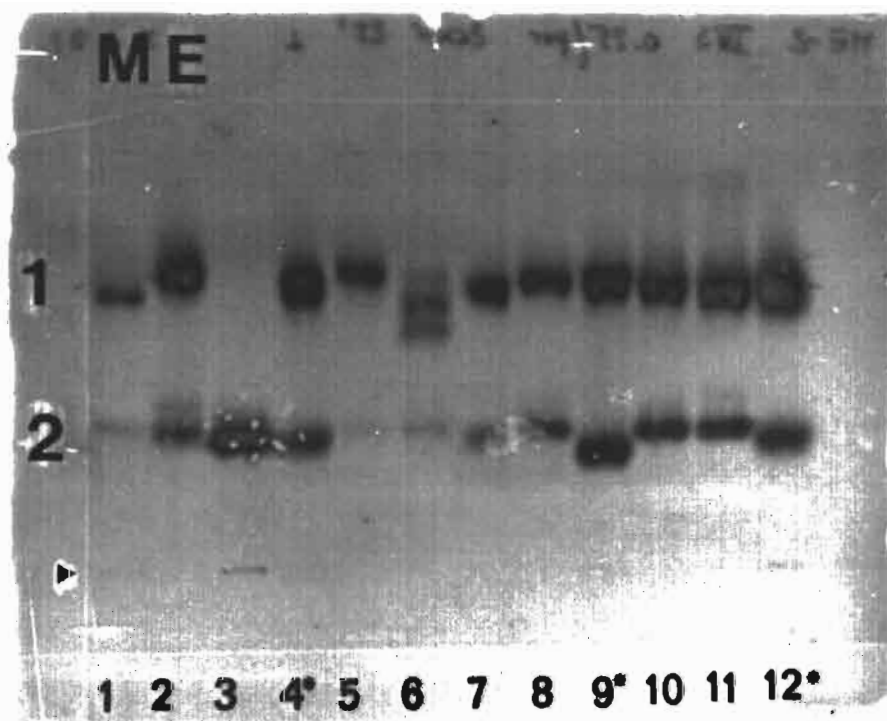


Figure 3: Profil électrophorétique de la Malic enzyme (ME). Les stocks de référence sont signalés par un astérisque: 4 et 12: Teh*, 9: SC43*; 1: A0007, 2: A0262, 3: A0276, 5: A0286, 6: A0290, 7: R0173, 8: R0174, 10: R0177, 11: R0203. La flèche indique l'origine de migration.

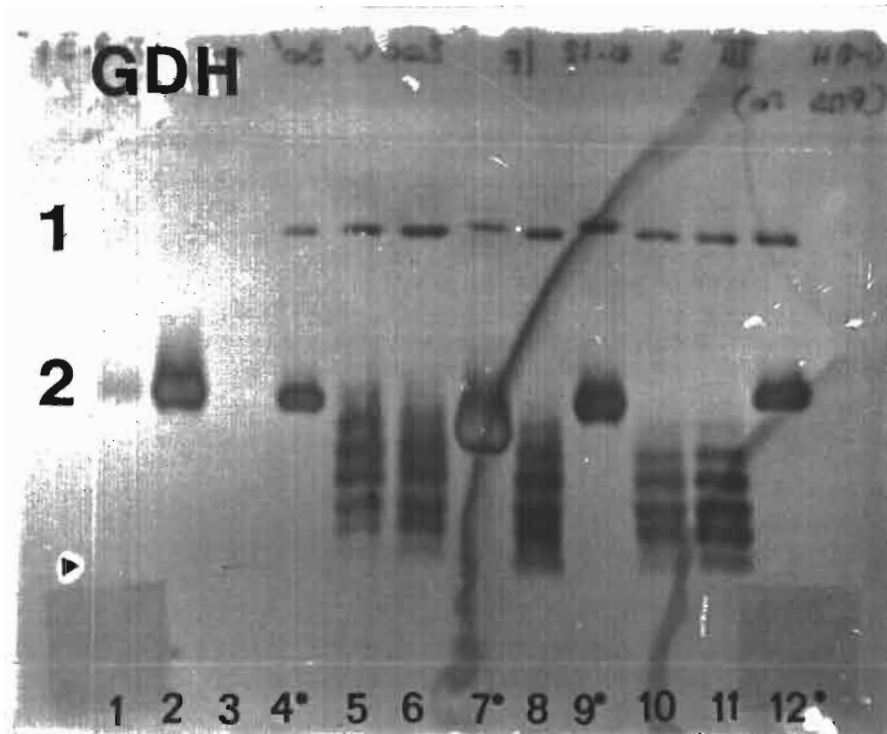


Figure 4: Profil électrophorétique de la Glutamate déshydrogénase (GDH). Les stocks de référence sont signalés par un astérisque: 4 et 12: Teh*, 7: Can III*, 9: SC43*; 1: A0055, 2: A0080, 3: A0083, 5: A0099, 6: R0107, 8: R0112, 10: R0145, 11: R0150. La flèche indique l'origine de migration.

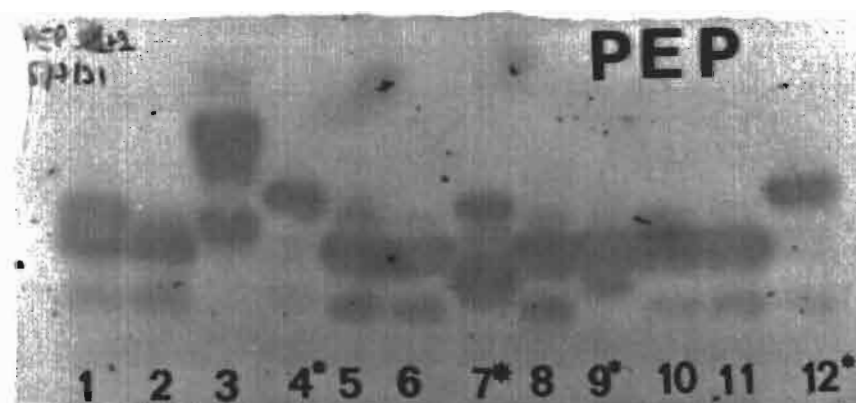


Figure 5: Profil électrophorétique de la Peptidase 1 et 2 (PEP 1, 2). Les stocks de référence sont signalés par un astérisque: 4 et 12: Teh*, 7: Can III*, 9: SC43*; 1: A0055, 2: A0080, 3: A0083, 5: A0099, 6: R0107, 8: R0112, 10: R0145, 11: R0150. La flèche indique l'origine de migration.

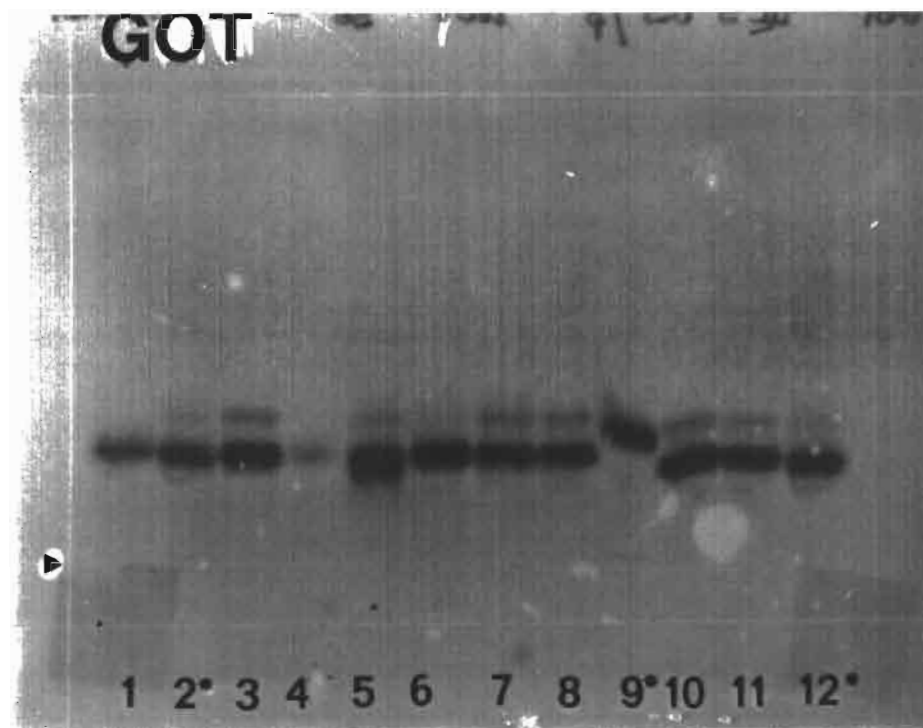


Figure 6: Profil électrophorétique de l'Aspartate aminotransférase (GOT). Les stocks de référence sont signalés par un astérisque: 2 et 12: Teh*, 9: SC43*; 1: A0096, 3: A0099, 4: A0098, 5: A0102, 6: R0107, 7: R0112, 8: R0143, 10: R0145, 11: R0150. La flèche indique l'origine de migration.

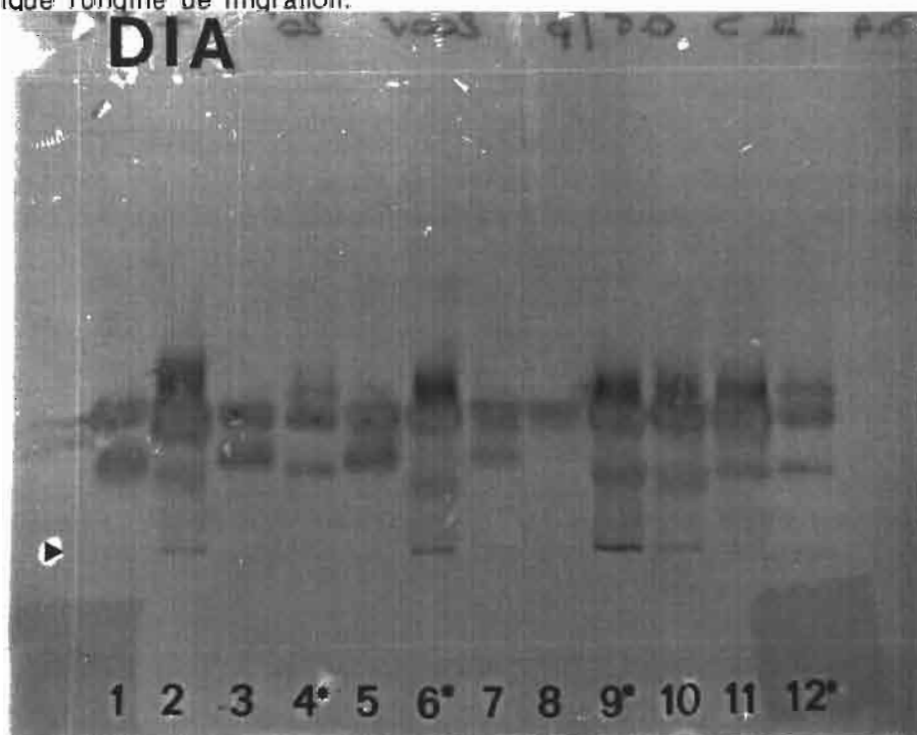


Figure 7: Profil électrophorétique de la Diaphorase (DIA). Les stocks de référence sont signalés par un astérisque: 4 et 12: Teh*, 6: Tula*, 9: SC43*; 1: A0092, 2: A0117, 3: A0268, 5: A0096, 7: A0098, 8: A0269, 10: A0147, 11: A0105. La flèche indique l'origine de migration.

2. Interprétation phénotypique

Certains profils ne se prêtent pas à une interprétation allélique car ils sont très complexes (bandes multiples). Ils sont alors décrits par les différentes bandes qui les composent (tableau II). Nous avons analysé les profils enzymatiques suivants: *DIA*, *GOT*, *HK*, *PEP* et *SOD* pour lesquels nous avons pu distinguer respectivement 9, 5, 4, 14 et 5 phénotypes différents (figures 5, 6 et 7). Les peptidases n'ont pu être interprétées génotypiquement, du fait également de la complexité des profils enzymatiques obtenus: nous observons un chevauchement des deux profils *PEP1* et *PEP2*, bien qu'elles soient révélés séparément et avec deux substrats distincts. Ceci confirme les résultats antérieurs obtenus chez *T. cruzi* (3)

Le stock A0007 est un cas remarquable, il présente un profil multilocus complexe, interprété comme le résultat d'un mélange de deux stocks différents. En effet:

- la *GPI* présente un profil à deux bandes : une au niveau de migration des autres bandes de *T. cruzi*, la deuxième à migration beaucoup plus rapide. Or un tel profil ne peut correspondre à un individu hétérozygote, qui présente normalement un profil électrophorétique hétérozygote à trois bandes (figure 2);
- nous observons souvent deux bandes pour des systèmes enzymatiques où aucun individu hétérozygote n'a été échantillonné;
- d'autre part le profil multilocus observé partage pour la majorité des loci des bandes communes avec les stocks A0083 et A0087 (tableau II).

II. Analyse de la variabilité génétique

1. La diversité des zymodèmes multilocus

Nous observons dans notre échantillonnage de Guyane française (27 stocks, A0007 étant retiré) 21 zymodèmes différents (tableau II). Le nombre maximum de stocks pour un même zymodème est de trois, il s'agit de A0055, A0080, A0092, qui ont été isolés de deux hôtes différents (*Philander opossum* pour A0055 et *Didelphis marsupialis* pour A0080 et A0092) et dans deux régions relativement éloignées (Station FRG, Montsinéry pour A0055 et A0080 et Acarouany pour A0092, distants de 200 km environ). Quatre autres zymodèmes contiennent chacun deux isolats. Il s'agit de:

- A0083/ A0087 provenant du même hôte (*Didelphis marsupialis*) et de la même localité (Station FRG, Montsinéry);
- A0099/ R0107, le premier isolé d'un réservoir sauvage (*Didelphis marsupialis*), le deuxième d'un vecteur domestique (*Rhodnius prolixus*), et dans deux

faciès géographiques différents (village forestier de Cacao pour A0099 et agglomération de Montjoly pour A0107, distants d'une quarantaine de kilomètres);

- R0145/ R0150, isolés de deux vecteurs différents (*Panstrongylus geniculatus* et *Rhodnius pictipes*) dans deux sites distincts (station FRG, Montsinéry (zone de forêt primaire) et agglomération de Cayenne, éloignées d'une trentaine de kilomètres);

- R0174/ R0177 provenant du même vecteur (*Panstrongylus geniculatus*) et du même endroit (Montjoly).

Des stocks appartenant au même zymodème ont donc été échantillonnés dans des hôtes différents et dans des lieux géographiquement éloignés (40km, 200km), nous avons donc des cas de zymodèmes ubiquistes.

La diversité zymodémique est grande. L'indice de diversité (indice de Whittman) est de 0,98, ce qui signifie que deux isolats pris au hasard dans la population ont 98% de chances d'appartenir à des clones différents.

2. Analyse phylogénique

2.1. Etude des matrices de distances

2.1.1. Distances de Jaccard

Elles ont été effectuées pour l'ensemble des systèmes enzymatiques révélés et selon deux approches:

- comparaison de bandes (DJ); tous les stocks ont été interprétés (tableau III).

La distance minimale observée (en ne tenant pas compte des distances nulles) est de 0.17 (entre A0099/ R0107 et A0145/ A0150, qui ne diffèrent que par un locus); et maximale de 1 (entre A0276 et Can III*). La distance moyenne est de 0,696 avec un écart-type de 0,1805.

Nous pouvons noter que les isolats A0083/ A0087 et A0276 présentent de très fortes valeurs de distances de Jaccard par rapport à l'ensemble des autres stocks étudiés, comprises respectivement entre 0,90-0,99 et 0,86-1,00. Ils ne sont donc pas plus proches des stocks de *T. cruzi* de référence que des autres stocks de Guyane, et nous les écarterons de l'analyse suivante (Pj).

Les autres stocks sont éloignés des trois stocks de référence SC43*, Tula* et CanIII*, avec des distances allant de 0,75 (entre R0203 et CanIII*) à 1 (entre A0276 et

	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Teh	SC	Tula	Can3							
	55	80	83	87	92	96	98	99	102	105	117	147	262	268	269	276	286	290	107	112	143	145	150	173	174	177	203	c11	43c1	c1	c1														
A0055	.00				.00	.76	.73	.58	.67	.58	.71	.74	.69	.65	.68		.63	.68	.58	.58	.67	.53	.53	.74	.74	.74	.78	.63	.90	.89	.91														
A0080	.00				.00	.76	.73	.58	.67	.58	.71	.74	.69	.65	.68		.63	.68	.58	.58	.67	.53	.53	.74	.74	.74	.78	.63	.90	.89	.91														
A0083	.96	.96																																											
A0087	.96	.96	.00																																										
A0092	.00	.00	.96	.96		.76	.73	.58	.67	.58	.71	.74	.69	.65	.68		.63	.68	.58	.58	.67	.53	.53	.74	.74	.74	.78	.63	.90	.89	.91														
A0096	.75	.75	.90	.90	.75		.26	.76	.76	.80	.60	.50	.71	.67	.70		.66	.70	.76	.73	.73	.73	.73	.76	.76	.76	.76	.69	.98	.92	.94														
A0098	.67	.67	.93	.93	.67	.34		.76	.76	.80	.73	.60	.75	.67	.70		.66	.66	.76	.76	.76	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73		
A0099	.51	.51	.99	.99	.51	.71	.69		.58	.48	.43	.53	.83	.76	.77		.72	.68	.00	.74	.37	.17	.17	.58	.63	.63	.63	.53	.93	.89	.88														
A0102	.61	.61	.96	.96	.61	.70	.69	.50		.67	.71	.74	.86	.73	.77		.79	.83	.58	.58	.67	.53	.53	.58	.53	.53	.67	.67	.93	.86	.88														
A0105	.49	.49	.98	.98	.49	.73	.71	.41	.63		.53	.63	.80	.69	.72		.79	.79	.48	.58	.58	.48	.48	.67	.71	.71	.71	.58	.87	.92	.91														
A0117	.64	.64	.96	.96	.64	.56	.69	.38	.65	.47		.37	.83	.76	.77		.76	.72	.43	.43	.43	.48	.48	.67	.78	.78	.74	.48	.95	.89	.91														
A0147	.69	.69	.94	.94	.69	.45	.53	.49	.69	.55	.35		.83	.80	.81		.79	.76	.53	.58	.63	.58	.58	.67	.74	.74	.74	.53	.98	.89	.91														
A0262	.69	.69	.94	.94	.69	.75	.79	.82	.82	.75	.81	.81		.46	.41		.44	.61	.83	.83	.83	.80	.80	.86	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80	.80		
A0268	.63	.63	.92	.92	.63	.73	.73	.73	.67	.64	.75	.77	.53		.16		.50	.56	.76	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	.73	
A0269	.68	.68	.93	.93	.68	.78	.78	.75	.72	.67	.75	.81	.51	.31			.38	.52	.77	.77	.72	.72	.72	.81	.72	.72	.77	.72	.91	.83	.75														
A0276	.91	.91	.99	.99	.91	.90	.90	.93	.90	.91	.91	.91	.97	.94	.93																														
A0286	.63	.63	.93	.93	.63	.73	.71	.70	.76	.75	.74	.77	.52	.57	.57	.97		.10	.72	.68	.72	.68	.68	.72	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68		
A0290	.68	.68	.97	.97	.68	.77	.74	.66	.79	.75	.70	.74	.64	.62	.65	.97	.26		.68	.63	.72	.72	.72	.72	.72	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68	.68		
R0107	.51	.51	.99	.99	.51	.71	.69	.00	.50	.41	.38	.49	.82	.73	.75	.93	.70	.66		.74	.37	.17	.17	.58	.63	.63	.63	.53	.93	.89	.88														
R0112	.53	.53	.96	.96	.53	.69	.73	.24	.53	.54	.41	.57	.82	.71	.77	.94	.66	.61	.24		.37	.31	.31	.63	.67	.67	.67	.58	.93	.89	.91														
R0143	.61	.61	.96	.96	.61	.69	.73	.32	.60	.53	.41	.61	.82	.71	.72	.94	.70	.70	.32	.35		.37	.37	.67	.71	.71	.71	.58	.90	.86	.91														
R0145	.48	.48	.96	.96	.48	.69	.67	.17	.48	.44	.47	.57	.78	.71	.72	.94	.66	.70	.17	.31	.35		.00	.53	.58	.58	.58	.48	.93	.86	.88														
R0150	.48	.48	.96	.96	.48	.69	.67	.17	.48	.44	.47	.57	.78	.71	.72	.94	.66	.70	.17	.31	.35	.00		.53	.58	.58	.58	.48	.93	.86	.88														
R0173	.68	.68	.96	.96	.68	.67	.62	.53	.53	.63	.63	.62	.81	.68	.76	.94	.63	.65	.53	.57	.62	.48	.48		.37	.37	.48	.63	.90	.83	.88														
R0174	.71	.71	.93	.93	.71	.69	.65	.57	.52	.65	.71	.69	.75	.67	.69	.97	.63	.63	.57	.62	.65	.53	.53	.31	.00	.37	.74	.90	.86	.84															
R0177	.71	.71	.93	.93	.71	.69	.65	.57	.52	.65	.71	.69	.75	.67	.69	.97	.63	.63	.57	.62	.65	.53	.53	.31	.00	.37	.74	.90	.86	.84															
R0203	.76	.76	.93	.93	.76	.71	.67	.63	.62	.67	.73	.72	.78	.71	.75	.98	.66	.66	.63	.67	.69	.58	.58	.42	.28	.28	.74	.90	.83	.77															
Teh c1	.54	.54	.96	.96	.54	.64	.68	.47	.57	.50	.47	.52	.76	.70	.71	.86	.71	.74	.47	.55	.57	.45	.45	.56	.66	.66	.72	.93	.89	.91															
SC43 c1	.87	.87	.99	.99	.87	.95	.95	.89	.90	.83	.90	.93	.88	.84	.90	.96	.91	.92	.89	.89	.85	.89	.89	.88	.89	.89	.86	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	.88	
Tula c1	.86	.86	.95	.95	.86	.88	.85	.86	.83	.87	.86	.85	.87	.81	.82	.99	.79	.86	.86	.86	.86	.83	.81	.81	.81	.84	.84	.78	.86	.75															
Can3 c1	.91	.91	.97	.97	.91	.94	.92	.88	.88	.90	.90	.91	.91	.91	.88	1	.87	.87	.88	.91	.91	.91	.88	.88	.88	.83	.83	.75	.91	.89	.81														

Tableau III: Matrice des distances de Jaccard: en bas Dj (pour tous les stocks), en haut Pj (les stocks A0083, A0087 et A0276 sont retirés)

	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	R	R	R	R	R	R	R	R	Teh	SC	Tula	Can3							
	55	80	83	87	92	96	98	99	102	105	117	147	262	268	269	276	286	290	107	112	143	145	150	173	174	177	203	c11	43cl	cl	cl					
A0055																																				
A0080	1.82																																			
A0083	1.16	1.98																																		
A0087	1.16	1.98	0.00																																	
A0092	1.77	2.47	2.68	2.68																																
A0096	1.43	2.61	1.60	1.60	0.88																															
A0098	1.77	2.02	1.97	1.97	0.62	0.20																														
A0099	2.00	2.39	4.86	4.86	0.39	0.75	0.68																													
A0102	1.68	1.84	2.68	2.68	0.54	0.77	0.66	0.39																												
A0105	1.85	2.44	3.95	3.95	0.38	0.82	0.74	0.25	0.56																											
A0117	1.61	2.33	2.54	2.54	0.59	0.47	0.77	0.20	0.58	0.34																										
A0147	1.61	2.88	2.42	2.42	0.70	0.31	0.41	0.34	0.68	0.44	0.25																									
A0262	2.37	0.93	2.07	2.07	0.78	0.92	1.06	1.18	1.20	0.98	1.18	1.18																								
A0268	1.81	1.30	1.92	1.92	0.63	0.91	0.89	0.83	0.64	0.63	0.89	1.00	0.46																							
A0269	2.36	1.29	1.94	1.94	0.69	1.05	1.03	0.88	0.78	0.66	0.93	1.15	0.39	0.14																						
A0276	2.18	2.52	∞	∞	1.88	1.82	1.81	2.15	1.88	1.88	1.88	1.88	5.57	2.51	2.38																					
A0286	1.80	1.13	1.99	1.99	0.57	0.85	0.81	0.72	0.91	0.86	0.86	0.98	0.40	0.50	0.49	5.54																				
A0290	1.76	1.45	2.73	2.73	0.67	0.97	0.92	0.60	1.03	0.85	0.73	0.85	0.61	0.55	0.65	5.53	0.15																			
R0107	2.00	2.39	4.86	4.86	0.39	0.75	0.68	0.00	0.39	0.25	0.20	0.34	1.18	0.83	0.88	2.15	0.72	0.60																		
R0112	1.41	3.30	2.66	2.66	0.44	0.69	0.80	0.15	0.43	0.44	0.23	0.46	1.18	0.77	0.96	2.54	0.61	0.50	0.15																	
R0143	2.01	2.40	2.04	2.04	0.47	0.60	0.69	0.21	0.46	0.39	0.24	0.56	1.03	0.67	0.69	2.55	0.63	0.73	0.21	0.24																
R0145	1.82	2.39	2.66	2.66	0.36	0.69	0.62	0.09	0.35	0.28	0.30	0.46	1.02	0.77	0.80	2.54	0.61	0.71	0.09	0.21	0.18															
R0150	1.82	2.39	2.66	2.66	0.36	0.69	0.62	0.09	0.35	0.28	0.30	0.46	1.02	0.77	0.80	2.54	0.61	0.71	0.09	0.21	0.18	0.00														
R0173	1.83	1.93	2.54	2.54	0.66	0.63	0.51	0.43	0.44	0.56	0.63	0.61	1.11	0.72	0.93	2.56	0.59	0.59	0.43	0.51	0.53	0.35	0.35													
R0174	2.52	1.69	2.04	2.04	0.79	0.68	0.56	0.51	0.48	0.63	0.76	0.68	0.89	0.64	0.75	5.82	0.56	0.54	0.51	0.61	0.55	0.43	0.43	0.16												
R0177	2.52	1.69	2.04	2.04	0.79	0.68	0.56	0.51	0.48	0.63	0.76	0.68	0.89	0.64	0.75	5.82	0.56	0.54	0.51	0.61	0.55	0.43	0.43	0.16	0.00											
R0203	1.89	1.27	1.97	1.97	0.98	0.77	0.64	0.69	0.62	0.79	0.95	0.85	1.03	0.78	0.93	5.59	0.63	0.62	0.69	0.80	0.73	0.58	0.58	0.29	0.14	0.14										
Teh c1	2.11	2.31	2.71	2.71	0.41	0.58	0.77	0.33	0.46	0.37	0.31	0.39	0.94	0.74	0.78	1.37	0.81	0.91	0.33	0.44	0.39	0.29	0.29	0.45	0.64	0.64	0.87									
SC43 c	1.91	1.52	3.97	3.97	1.66	2.46	2.45	1.67	1.76	1.35	1.72	2.10	1.63	1.30	1.59	2.48	1.70	1.87	1.67	1.67	1.48	1.67	1.67	1.42	1.61	1.61	1.42	1.49								
Tula c	1.02	1.70	2.33	2.33	1.31	1.45	1.21	1.27	1.09	1.42	1.39	1.45	1.39	1.07	1.06	5.22	0.97	1.27	1.27	1.27	0.93	0.99	0.99	1.09	1.18	1.18	0.90	1.44	0.93							
Can3 c	1.95	1.68	2.66	2.66	1.71	2.06	1.82	1.41	1.42	1.63	1.63	1.71	1.68	1.67	1.46	∞	1.36	1.35	1.41	1.69	1.71	1.41	1.41	1.41	1.42	1.15	1.15	0.83	1.70	1.50	1.02					

Tableau IV: Matrice de distances génétiques de Nei pour l'ensemble des stocks étudiés

Can III*). Elles se rapprochent davantage de Teh*, les distances étant comprises entre 0,45 pour A0145/ A0150 et 0,76 pour A0262, valeur qui ne sont cependant pas négligeables.

- comparaison de profils électrophorétiques (Pj) (tableau III).

La distance minimale observée (en ne tenant pas compte des distances nulles) est de 0,16 (entre A0268 et A0269 qui ne diffèrent qu'au niveau d'un seul locus); et maximale de 0,98 (entre A0147 et SC43* qui n'ont aucun locus en commun). La distance moyenne est de 0,71 avec un écart-type de 0,1685. Nous observons le même type de structuration que précédemment.

En considérant uniquement les stocks de Guyane (les stocks éloignés génétiquement n'étant pas considérés), nous observons les valeurs de distances de Jaccard suivantes:

- pour Dj: moyenne de 0,61 (maximum de 0,82; minimum de 0,17 en ne tenant pas compte des distances nulles), l'écart-type étant de 0,145.
- pour Pj: moyenne de 0,64 (maximum de 0,86; minimum de 0,1 en ne tenant pas compte des distances nulles), l'écart-type étant de 0,15.

2.1.2. Distances génétiques standards de Nei

Seuls les électromorphes simples ont été considérées (17 loci; voir § 1.1.). Les valeurs de distances observées sont données dans le tableau IV.

Il est intéressant de noter que trois stocks (A0083, A0087 et A0276) présentent des valeurs de distances génétiques très élevées ou infinies avec les autres stocks de l'échantillonnage. Ces stocks sont les mêmes que ceux qui présentaient les valeurs les plus importantes de Dj et Pj par rapport aux autres stocks.

Les distances calculées pour les autres isolats donnent des valeurs comprises entre 0 (identité génétique $I=1$, pour des isolats appartenant au même zymodème) et 2,06 (entre A0096 et CanIII*). Cette dernière valeur reflète une forte variabilité génétique, mais recoupe les résultats précédemment obtenus pour cette espèce(6). Comme pour les distances de Jaccard, nous pouvons noter que les stocks de Guyane s'apparentent davantage à Teh* qu'aux autres stocks de référence.

Les différentes valeurs moyennes de distances génétiques de Nei observées sont (les distances nulles n'ont pas été considérées):

<u>Echantillonnage</u>	<u>Distance min.</u>	<u>Distance max.</u>	<u>Distance moyenne</u>	<u>Ecart-type</u>
Total des stocks	0,09	∞	-	-
Stocks de <i>T.cruzi</i> (Guyane+ références)	0,09	3,3	0,96	0,6
Stocks de <i>T.cruzi</i> de Guyane génétiquement apparentés	0,09	3,3	0,83	0,58

Nous pouvons constater que les stocks de Guyane (sans considérer les trois stocks éloignés A0083, A0087 et A0276) présentent entre eux des valeurs moyennes de distances génétiques de Nei compatibles avec celles observées dans d'autres écosystèmes.

Nous avons effectué des tests de corrélation de distances génétiques de Nei observées entre paires de zymodèmes à partir d'échantillons aléatoires de loci, ceci pour les stocks de Guyane génétiquement apparentés. Pour cinquante paires de zymodèmes, avec 100 sondages pour chaque paire considérée, nous n'avons observé que trois résultats non significatifs (soit 3%). Une telle corrélation entre deux groupes de loci pris au hasard confirme une structure clonale de la population considérée (24).

Cette analyse a été portée sur un échantillon de zymodèmes provenant d'une même origine géographique (village forestier de Cacao); deux tests se sont avérés non significatifs sur les douze comparaisons effectuées (soit 16,6%), ce qui n'est plus en faveur de la structure clonale. Cependant l'échantillonnage étant très faible, le résultat obtenu peut être aberrant, et ne permet pas de rejeter une telle structure, même si des écarts à la clonalité pourraient être observés en zone forestière.

2.1.3. Conclusions

Etant donné les grandes valeurs de distances observées (Jaccard et Nei) entre chacun des trois stocks A0083, A0087 et A0276 d'une part, les stocks de référence de *Trypanosoma cruzi* et les autres stocks de Guyane française d'autre part, ces trois stocks pourraient être du "non-cruzi" et leur statut taxonomique reste à définir. Ils pourraient appartenir au taxon *Trypanosoma rangeli*. Cependant, ce dernier taxon apparait lui-même extrêmement hétérogène d'un point de vue génétique (40), et ses limites restent à définir. Les autres stocks de Guyane constituent un groupe hétérogène, mais présentent des distances avec les stocks de référence de *T. cruzi* entrant dans l'éventail de celles déjà observées au sein de cette espèce(4).

2.2. Analyse de dendrogrammes

Les distances de Jaccard (D_j) relevées ont été visualisées sous forme d'un dendrogramme qui regroupe l'ensemble des stocks étudiés, soit 27 stocks de Guyane française et 4 stocks de référence de *T. cruzi* (figure 8). Confirmant les observations faites quant aux distances génétiques, les stocks A0083, A0087, A0276 se distinguent nettement de l'ensemble des autres stocks de l'échantillonnage. L'arbre confirme l'apparement relatif de l'ensemble des autres stocks de Guyane française au stock de référence Teh* (*T. cruzi*), ce qui confirme les résultats préliminaires obtenus pour la même zone géographique (n°79). Au sein de cet ensemble certains groupes s'individualisent :

- groupe I incluant les stocks A0099, A0105, A0117, A0147, R0107, R0112, R0143, R0145, R0150 (soit 7 zymodèmes) avec des distances inférieures à 0,57;
- groupe II composé de 3 zymodèmes (R0173, R0174/R0177, R0203); les distances génétiques étant comprises entre 0 et 0,42;

Par ailleurs, trois groupes composés chacun de deux stocks (A0096/ A0098, A0268/ A0269 et A0286/ A0290) présentent des distances inférieures à 0,34; d'autres stocks n'appartiennent à aucun des groupes cités, il s'agit de A0055/ A0080/ A0092 (même zymodème), A0102 et A0262.

Nous avons ensuite comparé les trois types de dendrogrammes (tracés à partir des trois matrices de distances D_n , D_j et P_j), appliqué à notre échantillonnage, en enlevant les isolats éloignés génétiquement (A0083, A0087, A0276 et CanIII*, SC43*, Tula*) (figure 9). La corrélation statistique entre distances calculées (matrices de distances D_n , D_j et P_j) et distances mesurées sur les dendrogrammes correspondants est hautement significative (coefficients de corrélation respectifs: 0,83; 0,93 et 1, avec un nombre de degrés de liberté de 251). Les dendrogrammes résument donc de façon satisfaisante la variabilité observée dans les matrices de distances.

La concordance est parfaite entre les arbres générés à partir des deux distances de Jaccard (D_j et P_j). L'arbre basé sur les distances génétiques de Nei est dans son ensemble similaire aux deux précédents, cependant deux stocks sont placés différemment (A0102 et A0147).

Les corrélations entre les différents types de distances étudiés sont hautement significatives (le nombre de degrés de liberté (d.d.l.) étant de 251):

- entre distance génétique de Nei et distance de Jaccard D_j : coefficient de corrélation $r = 0,93$;
- entre distance génétique de Nei et distance de Jaccard P_j : $r = 0,85$;
- entre distances de Jaccard D_j et P_j : $r = 0,96$.

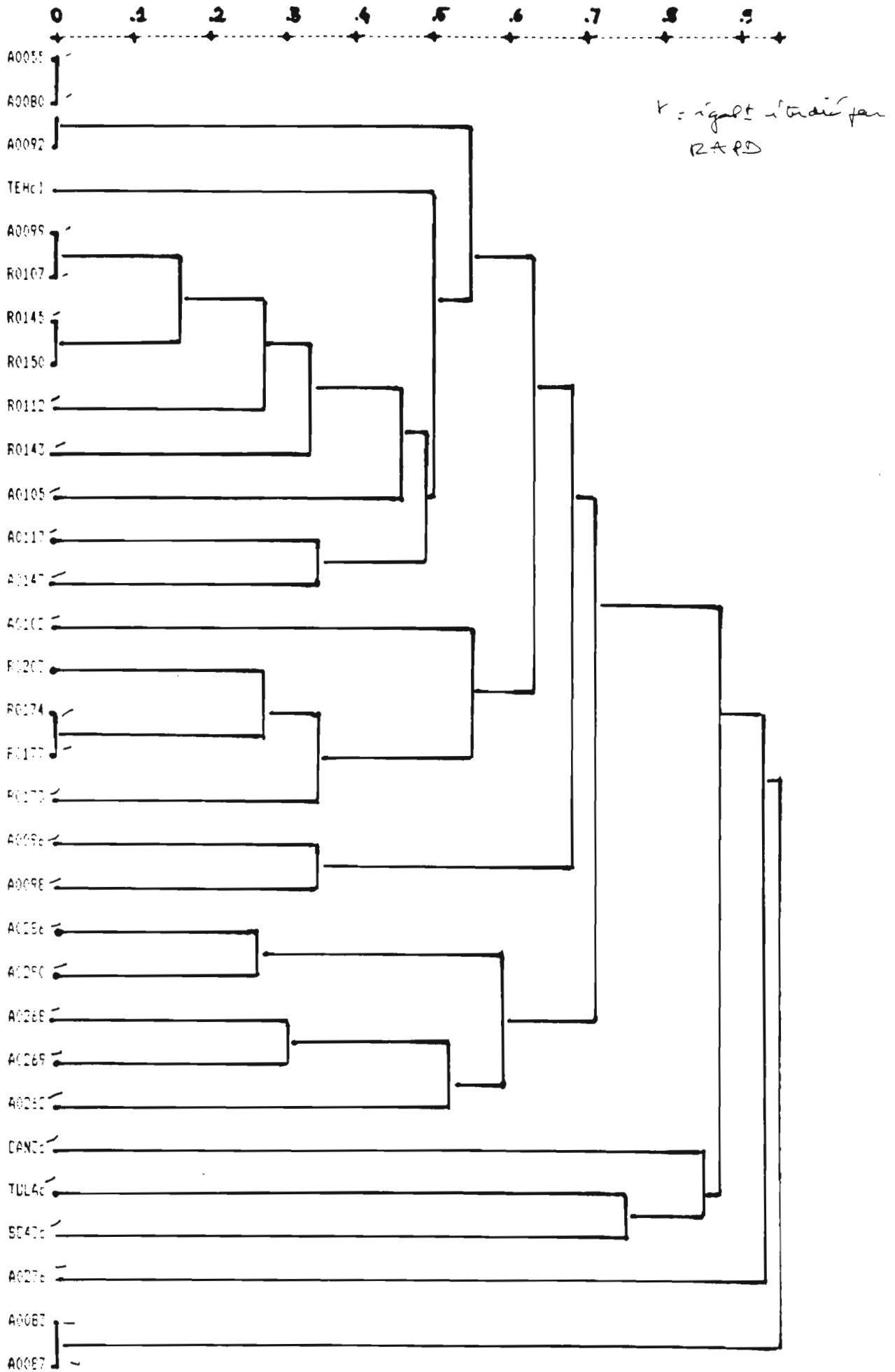


Figure 8: Dendrogramme basé sur les distances de Jaccard (D_j) par agglomération par liens moyens pour l'ensemble des stocks considérés.

Cette concordance très forte s'explique par le fait que ces différentes mesures de distances sont basées sur la même approche expérimentale, à savoir l'électrophorèse d'isoenzymes effectuée sur un nombre important de loci.

Les arbres présentés renforcent les conclusions exposées après l'analyse des distances génétiques en précisant l'individualisation de deux groupes de stocks (groupe I et groupe II) dans cet échantillonnage de Guyane française.

3. Analyses statistiques du mode de reproduction du parasite

3.1. Tests de ségrégation allélique intralocus

Ces tests sont basés sur le calcul de l'équilibre de Hardy-Weinberg. Les effectifs théoriques de chaque génotype unilocus étant généralement trop faibles pour faire l'objet d'un calcul du χ^2 , nous avons utilisé pour cela le test FACTO. Les résultats sont communiqués dans le tableau V. Ils montrent tous un même résultat convergent: un nombre de génotypes différents beaucoup plus faible que celui qu'on attendrait en cas de ségrégation libre, avec un déficit sévère d'hétérozygotes. Le déficit de génotypes est estimé par le test FACTO et le test χ^2 , en comparant l'effectif global observé des génotypes effectivement recensés avec leur effectif global théorique. Une telle approche statistique serait inutilisable si la fréquence théorique individuelle de chacun des génotypes était extrêmement faible, comme ce serait le cas pour des génotypes multilocus, ou des billets de loterie: leur fréquence observée globale serait alors automatiquement beaucoup plus élevée que leur fréquence théorique globale. Ce biaisage n'est pas à craindre dans le cas présent: la statistique montre effectivement que de nombreux génotypes qui devraient apparaître avec les fréquences alléliques relevées sont totalement absents.

Le déficit d'hétérozygotes pourrait suggérer un "effet Wahlund": la déviation par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg serait imputable des différences de fréquence allélique d'une localité à l'autre. Cependant, cette hypothèse n'est pas parcimonieuse pour expliquer globalement nos résultats. En effet, dans un tel cas de figure, on attendrait deux séries de résultats: d'une part que les allèles montrent une forte structuration géographique (différences évidentes de fréquence d'une localité à l'autre); d'autre part, que les génotypes unilocus surreprésentés tendent eux-mêmes à être restreints à certaines localités (20). Ici, rien de tel: bien que les effectifs observés soient trop limités pour concevoir des tests statistiques fiables, les allèles apparaissent présents dans toutes les localités, et les génotypes unilocus qui sont effectivement représentés tendent à être ubiquistes (échantillonnés dans plusieurs localités à la fois).

LOCUS	FREQUENCE		GENO-TYPE	EFFECTIF OBSERVE	FREQUENCE THEORIQUE	EFFECTIF THEORIQUE	TEST FACTO	TEST χ^2	PROBABILITE P
	ALLELE	OBSERVEE							
6PG	4	0,088	4/6	3	0,119	2,02	0,33		
	5	0,235	5/5	4	0,055	0,94	0,012		
	6	0,677	6/6	10	0,458	7,79	0,202		
	total	1	total	17	0,633	10,75	4,2 E-4	9,88	1 E-2 << 1 E-3
ACON	2	0,26	2/2	6	0,0676	1,55	3,5 E-3		
	3	0,74	3/3	17	0,5476	12,59	4,8 E-2		
	total	1	total	23	0,615	14,145	1,4 E-5	14,39	< 1 E-3
ALAT1	1	0,04	1/1	1	1,6 E-3	0,04	0,0393		
	2	0,84	2/2	21	0,7065	17,64	0,1		
	3	0,12	3/3	3	0,0144	0,36	6,42 E-3		
	total	1	total	25	0,7216	18,04	2,9 E-4	9,64	1 E-2 << 1 E-3
ALAT2	2	0,28	2/2	7	0,0784	1,96	2,5 E-3		
	3	0,72	3/3	18	0,518	12,96	0,033		
	total	1	total	25	0,5964	14,92	2,45 E-6	16,89	<< 1 E-3
EST2	2	0,72	2/2	18	0,52	12,96	0,035		
	3	0,24	3/3	6	0,058	1,44	2,5 E-3		
	4	0,04	4/4	1	0,0016	0,04	0,04		
	total	1	total	25	0,5792	14,48	1,18 E-6	18,16	<< 1 E-3
G6PD	1	0,043	1/1	1	1,9 E-3	0,046	0,045		
	4	0,043	4/4	1	1,9 E-3	0,046	0,045		
	5	0,29	5/5	7	0,0841	2,018	2,9 E-3		
	6	0,29	6/6	7	0,0841	2,018	2,9 E-3		
	7	0,334	7/7	8	0,112	2,67	3,5 E-3		
	total	1	total	24	0,633	10,75	7,6 E-14	60,7	<< 1 E-3
GAPD	2	0,02	2/2	1	5,84 E-3	0,14	0,13		
	3	0,146	3/3	3	0,0213	0,512	0,014		
	4	0,834	4/4	20	0,696	16,69	0,1		
	total	1	total	24	0,723	17,36	4,16 E-4	9,18	1 E-2 << 1 E-3
GDH2	1	0,08	1/1	2	6,4 E-3	0,32	1,15 E-2		
	2	0,24	2/2	6	5,8 E-2	1,44	2,5 E-2		
	3	0,52	3/3	12	0,27	6,76	2 E-2		
	4	0,02	3/7	2	4,1 E-2	1,04	0,89		
	5	0,04	4/8	1	8 E-4	0,02	2 E-2		
	7	0,04	5/9	2	3,2 E-3	0,08	3 E-3		
	8	0,02	total	25	0,38	9,49	3,13 E-11	40,85	<< 1 E-3
	9	0,04							
	total	1							
	IDH	3	0,3125	3/3	7	0,098	2,34	6,7 E-3	
4		0,67	3/5	1	0,0131	0,0315	NS		
5		0,021	4/4	16	0,449	10,77	2,63 E-2		
total		1	total	24	0,56	13,44	9,05 E-7	18,85	<< 1 E-3
LAP	3	0,167	3/3	4	0,028	0,672	4,2 E-3		
	4	0,833	4/4	20	0,693	16,66	0,098		
	total	1	total	24	0,721	17,31	3,9 E-4	9,27	1 E-2 << 1 E-3
ME1	1	0,18	1/1	4	0,0324	0,81	8,1 E-3		
	2	0,58	1/5	1	7,2 E-3	0,18	0,165		
	3	0,2	2/2	14	0,3364	8,41	0,018		
	5	0,02	2/6	1	0,0232	0,058	0,45		
	6	0,02	3/3	5	0,04	1	2,8 E-3		
	total	1	total	25	0,4392	10,98	1,17 E-9	31,92	<< 1 E-3
ME2	1	0,36	1/1	9	0,1296	3,24	3 E-3		
	2	0,6	2/2	15	0,36	9	1,24 E-2		
	3	0,04	3/3	1	0,016	0,4	0,332		
	total	1	total	25	0,5056	12,64	3,94 E-8	24,4	<< 1 E-3
PGM	1	0,042	1/1	1	1,76 E-3	0,043	0,0415		
	3	0,25	3/3	6	0,0625	1,5	3 E-3		
	4	0,083	4/4	2	6,9 E-3	0,172	0,012		
	5	0,458	5/5	11	0,21	5,04	5,7 E-3		
	6	0,125	6/6	3	0,0156	0,375	6,02 E-3		
	8	0,042	8/8	1	1,76 E-3	0,043	0,0416		
	total	1	total	24	0,4392	10,98	9,11 E-13	52,3	<< 1 E-3

Tableau V : Résultats des tests unilocus basés sur FACTO et FACTO-x2

LOCUS	ALLELE	FREQUENCE OBSERVEE	GENO- TYPE	EFFECTIF OBSERVEE	FREQUENCE THEORIQUE	EFFECTIF THEORIQUE	FACTO
ACON	2	0,25	2/2	2	0,0625	0,5	NS
	3	0,75	3/3	6	0,5625	4,5	NS
	total	1	total	8	0,625	5	0,023
ALAT2	2	0,34	2/2	3	0,1156	1,04	NS
	3	0,66	3/3	6	0,4356	3,92	NS
	total	1	total	9	0,5512	4,96	4,7 E-3
EST2	2	0,66	2/2	6	0,4356	3,92	NS
	3	0,22	3/3	2	0,049	0,44	NS
	4	0,12	4/4	1	0,015	4,96	NS
	total	1	total	9	0,499	4,96	1,9 E-3
G&PD	5	0,25	5/5	2	0,0625	0,5	NS
	6	0,25	6/6	2	0,0625	0,5	NS
	7	0,5	7/7	4	0,25	2	NS
	total	1	total	8	0,375	3	3,9 E-4
GDM2	2	0,22	2/2	2	0,048	0,432	NS
	3	0,72	3/3	6	0,52	4,68	NS
	7	0,055	3/7	1	0,08	0,72	NS
	total	1	total	9	0,65	5,81	0,02
IDH	3	0,39	3/3	3	0,152	1,37	NS
	4	0,56	3/5	1	0,044	0,4	NS
	5	0,056	4/4	5	0,314	2,9	NS
	total	1	total	9	0,51	4,59	2,3 E-3
LAP	3	0,34	3/3	3	0,1156	1,04	NS
	4	0,66	4/4	6	0,4356	3,92	NS
	total	1	total	9	0,5512	4,96	4,7 E-3
ME1	1	0,39	1/1	3	0,1521	1,37	NS
	2	0,39	1/5	1	0,044	0,4	NS
	3	0,11	2/2	3	0,1521	1,37	NS
	5	0,056	2/6	1	0,044	0,4	NS
	6	0,056	3/3	1	0,012	0,11	NS
	total	1	total	9	0,404	3,64	2,9 E-4
ME2	1	0,45	1/1	4	0,203	1,83	NS
	2	0,55	2/2	5	0,303	2,73	NS
	total	1	total	9	0,506	4,55	2,2 E-3
PGM	3	0,25	3/3	2	0,0625	0,5	NS
	4	0,125	4/4	1	0,0156	0,125	NS
	5	0,25	5/5	2	0,0625	0,5	NS
	6	0,25	6/6	2	0,0625	0,5	NS
	8	0,125	8/8	1	0,0156	0,125	NS
	total	1	total	8	0,219	1,75	5,3 E-6

Tableau VI : Résultats des tests unilocus FACTO (stocks de Cacao)

Un autre résultat suggère que les différences géographiques de fréquences alléliques n'expliquent pas à elles seules les déviations par rapport à l'équilibre, si on limite l'étude à la seule zone de Cacao (donc en situation de sympatrie), on observe un tableau similaire (tableau VI), avec déficit de génotypes unilocus portant notablement sur les hétérozygotes.

Les tests de ségrégation suggèrent donc fortement des entraves sévères aux échanges génétiques dans le présent échantillonnage, et il est très probable que ces entraves soient de nature biologique, et ne soient pas dûes à de simples obstacles géographiques, même si ces derniers peuvent moduler les résultats dans une certaine mesure.

Cependant, nous avons vu que les tests de ségrégation reposent sur l'hypothèse de diploïdie, qui n'est pas pleinement vérifiée dans le cas de cette espèce. Il est donc nécessaire de corroborer ces tests par d'autres ne présentant pas le même inconvénient.

3.2. Tests de recombinaison interloci

3.2.1. Déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison a été calculé pour les stocks supposés appartenir au taxon *T. cruzi* (A0083, A0087 et A0276 sont retirés). Les stocks et les loci pour lesquels la donnée isoenzymatique est manquante ont été retirés (codés 99, tableau II); il s'agit des trois stocks de référence Can III*, SC43* et Tula* et du stock A0269 ainsi que des loci 6PG, GDH1 et HK.

Sur 100 tirages aléatoires la probabilité d'obtenir un déséquilibre de liaison égal ou supérieur à celui observé dans l'échantillon (soit 0,003) est nulle.

Etant donné que le stock de référence Teh* a été isolé au Mexique, nous l'avons écarté de l'analyse, afin de tester le déséquilibre de liaison dans une même région. La probabilité d'obtenir un déséquilibre de liaison supérieur ou égal à celui observé dans l'échantillon (soit 0,0134) reste nulle.

L'association inter-loci observée est donc non aléatoire. Comme les tests de ségrégation, ce résultat indique une entrave sévère aux échanges génétiques. Nous avons alors calculé les déséquilibres de liaison dans différents groupes individualisés sur la base de critères phylogéniques (stocks génétiquement proches, groupes I et II), géographiques et d'hôte. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau VII.

Les déséquilibres de liaison sont généralement significatifs ($p = 0$) excepté pour la population composant le groupe phylogénique II (voir analyse des dendrogrammes) ainsi que pour celle isolée de *P. opossum*. Cependant une grande prudence s'impose dans l'interprétation de tous ces résultats concernant des sous-séries de stocks. En effet, les effectifs deviennent alors réduits et le risque de sondage aberrant augmente en conséquence (voir tests HAPLO).

3.2.2. Test de recombinaison FACTO

Ce test calcule la probabilité d'échantillonner tel génotype avec un effectif égal ou supérieur à celui qui est effectivement observé. Du fait que cette étude implique un grand nombre de loci hautement variables, la probabilité individuelle de chaque génotype multilocus est très faible. Il est alors remarquable que certains de ces génotypes aient été échantillonnés deux fois, et que l'un d'entre eux l'ait été trois fois. La tableau ci-dessous donne les résultats de ces tests, dont le niveau de signification est très élevé.

<u>Stocks présentant le même génotype multilocus</u>	<u>Résultat du test FACTO</u>
A0055/ A0080/ A0092	4,6 E-13
A0099/ R0107	2,4 E-7
R0145/ R0150	1,13 E-5
R0174/ R0177	1,12 E-8

3.2.3. Test de recombinaison HAPLO

L'échantillon est le même que dans la deuxième analyse du déséquilibre de liaison (soit les stocks de Guyane "*cruzi* vrai" uniquement, les stocks et les loci pour lesquels la donnée isoenzymatique est manquante ont été retirés (codés 99, tableau II)). Il est effectué avec 10000 tirages aléatoires.

Nombre d'individus attendus par zymodème	Probabilité
1	0,957
2	0,0428
3	0,0005
Nombre de zymodèmes différents attendus	Probabilité
22	0,0008
23	0,0425
24	0,957

Dans notre échantillonnage, le zymodème le plus représenté contient 3 stocks; or la probabilité théorique d'échantillonner 3 fois ou plus le même génotype multilocus est très faible (0,0005). Parmi 10000 tirages aléatoires il n'a jamais été rencontré plus de 3 stocks identiques et seulement 5 fois trois stocks identiques. L'hypothèse de départ étant la reproduction sexuée libre, elle n'est pas vérifiée, ce qui constitue un argument de plus en faveur d'une reproduction clonale chez *Trypanosoma cruzi*.

La probabilité théorique d'obtenir des génotypes tous différents est très grande (95,7%). Dans notre échantillonnage nous avons observé 18 zymodèmes différents; or la probabilité d'obtenir moins de 22 zymodèmes sur les 24 individus considérés est extrêmement faible. Sur 10000 tirages aléatoires il n'a jamais été obtenu moins de 22 zymodèmes différents. Ce résultat est donc en faveur d'une reproduction clonale (le seuil significatif est de 0,05).

Comme dans l'étude du déséquilibre de liaison, nous avons appliqué le test de recombinaison HAPLO aux différents groupes précédemment décrits. Les résultats sont regroupés dans le tableau VII.

Type de groupement	Groupes (nb individus)	DE	HAPLO	
Phylogénique	PHYL 1 (9)	0	38%	8%
	PHYL 2 (4)	10%	57%	48%
Par hôtes	<i>D. marsupialis</i> (11)	0	0	0
	<i>P. opossum</i> (3)	46%	100%	100%
Par vecteurs	<i>Rhodnius</i> (4)	0	93%	93%
	<i>P. geniculatus</i> (4)	0	10%	10%
Géographique	Cayenne et aggl. (5)	0	2%	27%
	FRG (forêt primaire) (5)	1%	2%	2%
	Cacao (village forestier) (9)	0	100%	100%

Tableau VII : Valeurs obtenues pour les tests de déséquilibre de liaison et de recombinaison ("haplo") en fonction des différents groupes individualisés (voir dans le texte)

DE- probabilité d'avoir un déséquilibre de liaison supérieur ou égal à celui observé dans l'échantillon;

HAPLO- le premier chiffre donne la probabilité théorique d'avoir n individus par zymodème, n étant effectivement observé dans l'échantillon; le deuxième chiffre représente la probabilité théorique d'observer un nombre de zymodèmes (génotypes multilocus différents), tel qu'il est observé dans l'échantillon.

PHYL I: A0099, A0105, A0117, A0147, R0107, R0112, R0143, R0145, R0150; PHYL II: R0173, R0174, R0177, R0203; P. - *Panstrongylus*; R. - *Rhodnius*.

Les subdivisions aboutissent à des effectifs observés réduits, et certains résultats deviennent non significatifs. Il est cependant à noter que même dans ces conditions, certains tests restent positifs, comme c'est le cas pour les zones géographiques impliquant Cayenne et son agglomération, ou la piste du FRG. Quoiqu'il en soit, comme pour les tests DE, ces résultats doivent être interprétés avec la plus grande prudence. En effet, avec des effectifs aussi réduits, la faiblesse du sondage augmente la probabilité d'échantillonnages aberrants, avec le risque, soit d'être dans l'impossibilité de confirmer une hypothèse positive vraie, soit de confirmer de façon erronée une hypothèse positive fausse. Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné dans "Matériels et Méthodes", les tests HAPLO sont entièrement basés sur l'observation ou la non-observation de génotypes multilocus échantillonnés plus d'une fois. S'il y a autant de génotypes que d'individus (ici, de stocks), ces tests sont forcément négatifs. Comme pour tout test statistique, une impossibilité de prouver statistiquement l'hypothèse de travail (ici: obstacles aux échanges génétiques) ne constitue aucunement une preuve que l'hypothèse nulle (ici: panmixie) est vraie. Dans le cas présent, si la diversité clonale est très forte, les tests HAPLO sont pris en défaut, alors que le test DE met en évidence des associations génotypiques interlocus non aléatoires. Une telle hypothèse expliquerait les résultats obtenus à Cacao, où les tests de ségrégation suggèrent une structure non panmictique, alors que les tests HAPLO sont négatifs du fait qu'il y a autant de génotypes que de stocks.

Comme pour les tests de ségrégation, le biaisage possible introduit par la structuration géographique peut être approché en considérant le paramètre d'ubiquité des génotypes: des différences géographiques de fréquences alléliques génèrent en elles-mêmes des déséquilibres de liaison, qui peuvent positiver les tests DE, FACTO et HAPLO. Cependant, comme pour les tests de ségrégation, ce facteur ne constitue certainement pas une explication globale de nos résultats. En effet, si tel était le cas, on attendrait (20) que les génotypes représentés plusieurs fois soient strictement limités à certaines localités. Ce n'est aucunement le cas ici: plusieurs des zymodèmes (génotypes multilocus) représentés plus d'une fois sont en même temps relevés dans des localités différentes.

Un autre biaisage possible est à mentionner comme pouvant interférer avec la répartition des génotypes multilocus: il s'agit de la sélection naturelle. En effet, on peut imaginer que certains génotypes multilocus présentent une adaptativité supérieure et soient de ce fait surreprésentés. Mais ceci est une hypothèse explicative globale de nos résultats extrêmement peu parcimonieuse dans le cadre d'une structure potentiellement panmictique. En effet, si l'on peut admettre que certains génotypes des loci donnés soient favorisés par la sélection, la lourdeur de l'hypothèse augmente géométriquement avec le nombre de loci étudiés. Ainsi, s'il est hautement probable que la sélection naturelle

intervienne dans le cadre d'une structure clonale (en favorisant la dissémination de certains clones "performants"), il est difficile d'admettre que ce facteur soit à lui seul susceptible de générer une "structure pseudoclonale" chez un organisme présentant en fait une recombinaison sexuée libre.

Conclusions

La méthode isoenzymatique appliquée à 28 stocks de *Trypanosoma cruzi* de Guyane française a permis de préciser la ploïdie, la diversité génétique et le mode de reproduction des populations de ce parasite, ainsi que les interactions possibles entre cycle sylvestre et cycle domestique.

L'ensemble des résultats électrophorétiques basé sur un nombre important de systèmes enzymatiques (22 loci), dont certains nouveaux qui se sont avérés très discriminants (*DIA* et *GOT* où respectivement 9 et 5 phénotypes différents ont été identifiés), montre que les stocks de Guyane constituent un groupe particulièrement hétérogène. L'indice de diversité (indice de Whittman) est de 0,98 alors qu'il n'est que de 0,65 pour des stocks isolés de patients chagasiques en Bolivie (cycle domestique) (41).

Trois stocks (A0083, A0087 et A0276) semblent présenter un statut taxonomique particulier, les distances observées entre eux et les stocks de référence de *T. cruzi*, ainsi qu'avec les autres stocks de Guyane sont extrêmement grandes, voire infinies. Ils peuvent donc être considérés comme du "non-*cruzi*" et leur position taxonomique requiert des études supplémentaires.

L'ensemble des autres stocks, plus apparenté à Teh*, qu'aux autres stocks de référence (Can III*, SC43* et Tula*), présentent entre eux des distances génétiques et phénétiques très grandes (distances génétique de Nei allant jusqu'à 0,98), mais néanmoins compatibles avec celles obtenues précédemment sur un plus grand échantillonnage de stocks de *T. cruzi* (6).

L'étude statistique de la ségrégation allélique et de la recombinaison au sein de l'ensemble des stocks de *Trypanosoma cruzi* de Guyane française est en faveur d'une reproduction principalement clonale, comme cela a déjà été relevé dans d'autres écosystèmes pour cette même espèce. Des différences de fréquences alléliques entre localités (structuration géographique), même s'ils peuvent interférer avec ces résultats, ne constituent probablement pas une explication globale parcimonieuse: en effet, on observe de nombreux génotypes unilocus présents dans deux ou plusieurs localités, et il en

va de même pour certains génotypes multilocus. Un résultat inverse (confinement des génotypes unilocus ou multilocus hyperreprésentés des localités données) est attendu en cas de structuration géographique forte. Nous avons tenté de cerner le biaisage dû à cette structuration géographique en étudiant séparément les différentes localités. Les résultats restent positifs en ce qui concerne les tests de ségrégation pour la localité de Cacao, la seule pour laquelle on dispose de suffisamment de stocks. Les tests de recombinaison deviennent négatifs dans quelques cas, mais les effectifs sont très réduits (au plus 9 stocks), et un résultat négatif sur des séries aussi réduites ne saurait constituer une vérification de l'hypothèse nulle. La diversité génotypique semble plus importante que dans les cycles domestiques. Ce grand nombre de clones différents pourrait traduire une réponse adaptative aux niches écologiques hautement diversifiées qu'offre l'écosystème de la forêt primaire. Ceci suggère également que des échanges sexuels occasionnels seraient plus fréquents en cycle sylvestre, et interféreraient, à l'échelle évolutive, avec la structure clonale dominante. Ces hypothèses de travail ne pourront être départagées de façon fiable qu'à la faveur de progrès des méthodes d'analyses techniques (séquençage de certains gènes mettant en évidence des phénomènes de recombinaison limités) et théoriques (amélioration des approches statistiques visant à évaluer la "dose" de sexe pouvant moduler la structure clonale des parasites à l'échelle évolutive).

Grâce à la caractérisation génétique fine réalisée dans notre étude nous avons pu isoler deux stocks appartenant au même zymodème, l'un de *Didelphis marsupialis* (cycle sylvestre), l'autre de *Rhodnius prolixus* (vecteur domestique gardant de nombreux foyers sylvestres). Ce vecteur serait capable d'introduire des stocks du cycle sylvestre en cycle domestique, ce qui représente un risque non négligeable d'extension de la maladie de Chagas.

Il serait nécessaire d'augmenter l'échantillonnage afin de mieux cerner les caractéristiques génétiques et épidémiologiques des populations sylvestres de *Trypanosoma cruzi*; ainsi que la dynamique de passage d'un type de cycle à un autre. L'application d'autres moyens d'analyse telles que les sondes kinétoplastiques (sondes spécifiques de clones) développées par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) devrait faciliter des études extensives de terrain. L'isolement des stocks et leur amplification en culture n'est alors pas nécessaire car les sondes d'ADN permettent une caractérisation directe des clones ainsi qu'une meilleure évaluation des infections mixtes (présence de deux clones différents dans un même hôte) (42,43).

Bibliographie

1. WHO. TDR Tenth Program Report. Tropical diseases, Progress in research; 1991: Chap. 7; 69-77.
2. **Tibayrenc M., Cariou M.L. and Solignac M.** Interprétation génétique des zymogrammes de Flagellés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. C. R. Acad. Sc. Paris; 2/03/1981; tome 292, série III: 623-625.
3. **Tibayrenc M., Cariou M.L., Solignac M., Dedet J.P., Poch O. and Desjeux P.** New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. *Genetica*; 1985; 67: 223-230.
4. **Tibayrenc M. and Ayala F.J.** Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*; 1988; 42 (2): 277-292.
5. **Lanar D.E., Levy L.S. and Manning J.E.** Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*; 1981; 3: 327-341.
6. **Tibayrenc M., Ward P., Moya A. and Ayala F.J.** Natural populations of *Trypanosoma cruzi* have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Evolution)*; Janvier 1986; 83: 115-119.
7. **Tibayrenc M., Kjellberg F. and Ayala F.J.** A clonal theory of parasitic Protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *PNAS USA (Evolution)*; April 1990; 87: 2414-2418.
8. **Zeledon R. and Rabinovich J.E.** Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Ann. Rev. Entomol.*; 1981; 26: 101-133.
9. **Miles M.A., Pova M., Prata A., Cedillos R.A., De Souza A.A. and Macedo V.** Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet*; 1981; 1: 1338.
10. **Brénière S.F., Tibayrenc M., Antezana G., Pabon J., Carrasco R., Selaes H. and Desjeux P.** 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. Sc. Paris; 1985; tome 300, série III, n°15: 555-557.

11. **Sanchez G., Wallace A., Olivares M., Diaz N., Aguilera X., Apt W. and Solari A.** Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes: *in vitro* differentiation of epimastigotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. Exp. Parasitol.; 1990; 71: 125-133.

12. **Hunter R.L. and Markert C.L.** Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis. Science; 1957; 125: 1294-1295.

13. **Lewontin R.C. and Hubby J.L.** A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics; 1966; 54: 595-609.

14. **Prakash L., Lewontin R.C. and Hubby J.L.** A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics; 1969; 61: 841-868.

15. **Toyé P.J.** Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1974; 68: 147.

16. **Miles M.A., De Souza A.A., Povoá M., Shaw J.F., Lainson R. and Toyé P.J.** Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature; 1978; 272: 819-821.

17. **Miles M.A., Lanham S.M., De Souza A.A. and Povoá M.** Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1980; 74: 221-237.

18. **Miles M.A., Toyé P.J., Oswald S.C. and Godfrey D.G.** The identification by isozyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1977; 71: 217-225.

19. **Zhang Q., Tibayrenc M. and Ayala F.J.** Linkage disequilibrium in natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease. J. Protozool.; 35: 81-85.

20. **Tibayrenc M., Kjellberg F., Arnaud J., Oury B., Brenière S.F., Dardé M.L. and Ayala F.J.** Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Evolution)*; 1991; 88.
21. **Morel C., Chiari E., Plessman C.E., Mattel D.M., Romanha A.J. and Simpson L.** Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1980; 77: 6810-6814.
22. **Tibayrenc M. and Ayala F.J.** Forte corrélation entre classification isoenzymatique et variabilité de l'ADN kinétoplastique chez *Trypanosoma cruzi*. *C. R. Acad. Sc. Paris*; 1987; 304: 89-92.
23. **Brénière S.F., Araniki I., Le Ray D. and Tibayrenc M.** L'analyse SDS-PAGE des protéines et antigènes de surface révèle une forte hétérogénéité chez les clones naturels de *Trypanosoma cruzi*, corrélée à la variabilité isoenzymatique. *C. R. Acad. Sci. Paris (Immunologie (Médecine et thérapeutique))*; 1991; 312, série III: 449-454.
24. **Miller R.D. and Hartl D.L.** Biotyping confirms a nearly clonal population structure in *Escherichia coli*. *Evolution*; 1986; 40: 1-12.
25. **Dedet J.P., Chippaux J.P., Goyot F., Pajot X., Tibayrenc M., Geoffroy B., Gosselin H. and Jacquet-Vialet P.** Les hôtes naturels de *Trypanosoma cruzi* en Guyane française. Endémicité élevée du zymodème I chez les marsupiaux sauvages. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*; 1985; 60, n°2: 111-117.
26. **Tibayrenc M., Echalar L. and Desjeux P.** Une méthode simple pour obtenir directement des isolats de *Trypanosoma cruzi* à partir de tube digestif du triatome vecteur. *Cah. ORSTOM, sér. Entomol. Med. et Parasitol.*; 1982; XX, n°3: 187-188.
27. **Godfrey D.G. and Kilgour V.** Enzyme electrophoresis in characterizing the causative agent of Gambian Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 1976; 71: 217-225.
28. **Tibayrenc M. and Le Ray D.** General classification of the isoenzymatic strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and comparison with *T.(S.)marinkelli* and *T. (Herpetosoma) rangeli*. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*; 1984; 64: 239-248.

29. **Kreutzer R.D. and Sousa O.E.** Biochemical characterization of *Trypanosoma spp.* by isozyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 1981; 30 (2): 308-317.
30. **Shaw C.R. and Prasad R.** Starch gel electrophoresis of enzymes-a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*; 1970; 4: 297-320.
31. **Harris H. and Hopkinson D.A.** Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam / Oxford: North Holland Publishing; 1976.
32. **Richardson B.J., Baverstock P.R. and Adams M.** A handbook for animal systematics and population studies: Academic press; 1986.
33. **Pasteur G.** Les paramètres statistiques communément utilisés dans l'exploitation des résultats de l'électrophorèse des protéines et leur avenir en systématique. In Goyffon M. and d'Hondt J.L. *Electrophorèse et taxonomie*. Paris: Société zoologique de France; 1985: 141-180.
34. **Whittam T.S.** Clonal dynamics of *Escherichia coli* in its natural habitats. *Antonie van Leeuwenhoek*; 1989; 55: 23-32.
35. **Jaccard.** Distances généalogiques et distances génétiques. *Cahiers d'Anthropologie et d'Ecologie humaine*; 1973; 1: 11-124.
36. **Nei M.** Genetic distances between populations. *Amer. Natural.*; 1972; 106: 283-292.
37. **Serres E. and Roux M.** Pratique de la classification automatique. L'exemple des *Leishmania*. *Leishmania: Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques* (Coll. int. CNRS/INSERM, 1984); 1986: 27-40.
38. **Tibayrenc M.** Les isoenzymes et l'entomologie médicale. *Cah. ORSTOM série Entomologie médicale et parasitologie*; 1979; XVII,n°4.
39. **Pasteur N., Pasteur G., Bonhomme F., Catalan J. and Britton-Davidian J.** Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Paris: Lavoisier éd. Tech. Doc.; 1987.

40. Miles M.A., Arias J.R., Valente S.A.S., Vaiff R.D., De Souza A.A., Povoá M.M., Lima J.A.N. and Cedillos R.A. Vertebrate hosts and vectors of *Trypanosoma rangeli* in the Amazonian Basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 1983; 32: 1251-1259.
41. Brénière S.F., Carrasco R., Revollo S., Aparicio G., Desjeux P. and Tibayrenc M. Chagas' disease in Bolivia: clinical and epidemiological features and zymodemes variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 1989; 41, n°5: 521-529.
42. Veas F., Cuny G., Brénière S.F. and Tibayrenc M. Subspecific kDNA probes for major clones of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*; 1991; 48: 79-82.
43. Veas F., Brénière S.F., Cuny G., Brengues C., Solari A. and Tibayrenc M. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cellular and Molecular Biology*; 1991; 37 (1): 73-84.

ANNEXE I

CONDITIONS DE MIGRATION

ENZYME	TAMPON D'ELECTROPHORESE	DILUTION D'IMBIBITION	DILUTION DE MIGRATION	VOLTAGE	TEMPS
6PGD*	A	0.25	0.75	200V	25'
ACON*	B	0.5	pur	200V	20'
AK*	C	0.2	0.85	150V	20'
ALAT*	D	0.25	0.75	200V	20'
DIA*	A	0.5	pur	200V	20'
EST*	E	0.75	pur	200V	20'
FK*	C	0.2	0.85	150V	20'
G6PD*	B	pur	pur	200V	25'
GAPD	A	0.3	pur	200V	30'
GDH	A	0.12	pur	200V	30'
GOT	A	0.5	pur	160V	30'
GPI*	A	0.25	pur	200V	25'
HK*	C	0.3	0.85	150V	20'
IDH	A	0.3	pur	200V	25'
LAP*	A	0.3	pur	200V	25'
MDH*	A	pur	pur	200V	30'
ME*	A	0.25	pur	200V	25'
MPI*	C	0.15	0.6	200V	20'
PEP*	B	pur	pur	200V	30'
PGM*	C	0.15	0.6	200V	20'
PK*	C	0.2	0.85	150V	20'
SOD*	F	pur	pur	300V	30'

* Systèmes enzymatiques nécessitant une réfrigération pendant la migration

A (III Shaw): Tris 0.5M - Acide borique 0.65M - EDTA 0.016M, pH 8.0

B (HR): Tris barbital sodium I=0.02, pH 9.0 (Helena® laboratories, Texas, USA)

C (II Kreutzer): Tampon phosphate 0.2M pH 7.0

D (2 Lanham): Tris 0.66M - Acide citrique anhydre 0.083M, pH 8.6

E (C Richardson 2X): Tris 0.05M - Acide maléique 0.02M, pH 7.8

F: Tris 0.1M - Acide borique 0.3M - Sucrose 1%, pH 7.6

ANNEXE II

SOLUTIONS DE REVELATION

ENZYME	TAMPON REACTION (qsp 10 ml)	COMPOSANTES
6PG	Tris HCl 0.3M pH8.0	6-phosphogluconic acid...10mg; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
ACON	Tris HCl 0.17M pH8.0	Cis-aconitic acid...14mg; Isocitrate déhydrogénase...1U.I.; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
ALAT	Tampon ALAT (NaH ₂ PO ₄ 0.025M Na ₂ HPO ₄ 0.08M, pH7.4)	α-ketoglutaric acid...5mg; L-Alanine...10mg; Lactate déhydrogénase (Bovine heart)...20U.I.; NADH...100µl.
AK	I Kreutzer	γ-D-glucose...50mg; ADP...10mg; G6PD...10U.I.; Hexokinase...10U.I.; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
DIA	Tris HCl 0.1M pH8.0	MgCl ₂ ...250µl; NADH...100µl; NADPH...100µl; NBT...100µl.
EST	Tampon phosphate 0.1M pH6.3	4-methylumbelliferyl acetate...10mg dans 2.5ml acétone.
FK	Tris HCl 0.1M pH8.0	β-fructose...15mg; ATP...10mg; GPI...10U.I.; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
G6PD	Tris HCl 0.5M pH7.0	Glucose-6-phosphate...5mg; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
GAPD	Tris HCl 0.25M pH7.0	Fructose-1,6-diphosphate...12.5mg; Aldolase...2.4U.I.; Arsenic acid...100µl; Na pyruvate...100µl; NAD...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
GDH	Tris HCl 0.1M pH7.0	Glutamic acid...100mg; NAD...120µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
GOT	Tris HCl 0.1M pH8.0 (*)	L-Aspartic acid...30mg; α-ketoglutaric acid...25mg; Pyridoxal-5-phosphate...5mg; Fast blue BB...20mg.
GPI	Tris HCl 0.3M pH7.0	Fructose-6-phosphate...10mg; G6PD...4U.I.; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
HK	Tris HCl 0.25M pH8.0	Glucose...20mg; ATP...10mg; G6PD...10U.I.; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
IDH	Tris HCl 0.1M pH8.0	Isocitric acid...10mg; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
LAP	Tris Maléate 0.2M pH6.0	L-Leucine β-naphtylamide...15mg; Fast Black K salt...10mg.
MDH	Tris HCl 0.12M pH8.0	Malate 1.0M pH7.0...900µl; NAD...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
ME	Tris HCl 0.235M pH7.0	Malate 1.0M pH7.0...600µl; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
MPI	Tris HCl 0.3M pH7.0	Mannose-6-phosphate...5mg; G6PD...4U.I.; GPI...6U.I.; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
PEP	Tris HCl 0.1M pH8.0	L-leu-leu-leu...15mg (PEP1) ou L-leu L-ala...5mg (PEP2); L-aminoacid oxidase...100µl; Peroxidase...100µl; MgCl ₂ ...150µl; MnCl ₂ ...150µl; 3-amino-9-ethyl-carbazole...10mg dans 400µl d'éthanol.
PGM	Tris HCl 0.3M pH8.0	Glucose-1-phosphate...20mg; G6PD...8U.I.; MgCl ₂ ...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
PK	Tris HCl 0.1M pH 8.0	Phosphoenolpyruvate...10mg; Glucose...10mg; ATP...20mg; Hexokinase...10U.I.; G6PD...10U.I.; MgCl ₂ ...250µl; KCl 1.0M...250µl; NADP...100µl; NBT...100µl; PMS...100µl.
SOD	Tampon phosphate 0.1M pH7.5	Riboflavine 0.0032% dans tampon phosphate...9.2ml; EDTA 0.2M...100µl; INT...3.5mg dans 750µl d'eau.

ANNEXE II (suite)

ABBREVIATIONS ET CONCENTRATIONS DES SOLUTIONS PREPAREES A L'AVANCE

•Activateurs:

Acide arsenique	6 mg/ml	(1 dose=100µl)
Na Pyruvate	50 mg/ml	(1 dose=100µl)
MgCl ₂ 1.0M	20.33 g de MgCl ₂ anhydre;	H ₂ O qsp 100ml
MnCl ₂ 0.1M	1.98 g de MnCl ₂ .4H ₂ O;	H ₂ O qsp 100ml

•Coenzymes:

EDTA	Acide ethylène-diamine-tetra-acétique	
NAD	β-Nicotinamide adenine dinucleotide	40 mg/ml (1 dose=100µl)
NADP	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	50 mg/ml (1 dose=100µl)
NADH	β-Nicotinamide adenine dinucleotide forme réduite	50 mg/ml (1 dose=100µl)
NADPH	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate forme réduite	40 mg/ml (1 dose=100µl)

•Colorants:

INT	Iodo nitro tetrazolium violet	
NBT	Nitro blue tetrazolium	50 mg/ml (1 dose=100µl)
PMS	Phenazine methosulfate	30 mg/ml (1 dose=100µl)

•Enzymes:

L-aminoacid oxidase	10 mg/ml	(1 dose=100µl)
Peroxidase	10 mg/ml	(1 dose=100µl)

•Autres:

ADP	Adenosine 5'-diphosphate
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
G6PD	Glucose-6-phosphate déhydrogénase
GPI	Glucose phosphate isomérase

Malate 1.0M pH7.0:	Malic acid	13.41g
	H ₂ O	35ml
	NaOH 4N	50ml

Réajuster le pH avec précaution et compléter à 100 ml; aliquoter en doses de 10 ml et conserver à -70°C.

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC
MONTPELLIER II

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES DE
PARASITOLOGIE

Projet de recherche

Etude de l'interface cycle
sylvestre - cycle domestique chez
Trypanosoma (Schizotrypanum)
cruzi en régions subandines
boliviennes

présenté par Katarzyna LEWICKA
le 1^{er} octobre 1991

Laboratoire de génétique des parasites et des vecteurs (ORSTOM-
Montpellier) sous la direction du D. Michel TIBAYRENC

TABLE DES MATIERES

Resumé

Justification des travaux	1
Position actuelle du sujet	1
I. Situation épidémiologique en Bolivie	1
II. La variabilité génétique de Trypanosoma cruzi	1
III. Sondes spécifiques des clones de Trypanosoma cruzi	2
Description du projet	3
I. Objectif	3
II. Programme	3
<u>1. Sélection de la zone d'étude</u>	3
1.1. Vecteurs	3
1.2. Enquête sérologique	3
<u>2. Etude du cycle sylvestre</u>	4
2.1. Etude isoenzymatique	4
2.2. Développement des sondes d'ADN	4
<u>3. Etude du cycle domestique</u>	4
<u>4. Analyse des résultats</u>	4
4.1. Etude isoenzymatique	4
4.2. Prévalence des clones identifiés dans les différents hôtes	5
III. Intérêt du travail et conséquences	5
<u>1. Intérêts scientifiques</u>	5
<u>2. Intérêts pour le développement</u>	5

Collaborations possibles avec d'autres chercheurs 5

Bibliographie 6

Services d'affectation : Institut Bolivien de Biologie D'altitude (IBBA)
Département de Parasitologie
La Paz, Bolivie (2 ans)

ORSTOM, centre de Montpellier
Laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs
34032 Montpellier (1 an)

Objet : *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), agent de la maladie de Chagas ou trypanosomiase Latino-Américaine.

Etude de l'interface cycle sylvestre-cycle domestique en régions subandines boliviennes

Encadrement scientifique :

USTL (Formation Doctorale en cours de réhabilitation)
- Pr. L. Euzet; Pr. L. Combes; Dr. D. Camus

ORSTOM Directeur de thèse
MONTPELLIER Dr. M. Tibayrenc, DR2 ORSTOM, Directeur du Laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs, Montpellier

IBBA S.F. Brenière, Département de Parasitologie
CR1 ORSTOM, affectation longue durée IBBA

Dr. F. Noireau, Département de parasitologie
CR1 ORSTOM, affectation longue durée IBBA

Resumé

La maladie de Chagas ou trypanosomiase latino-américaine, dont l'agent est un Protozoaire parasite: *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, constitue un problème de santé majeur en Bolivie. Le cycle de transmission est essentiellement domestique, mais l'apparition d'un cycle sylvestre dans les nouvelles zones de colonisation en régions subandines boliviennes pourrait provoquer une extension de l'endémie. Les souches sylvestres semblent génétiquement différentes des nombreux clones provenant de cycles domestiques, mais aucune étude ne permet actuellement de connaître la situation de la maladie de Chagas dans ces régions et quel est le risque encouru par les populations. Les propriétés génétiques de ces différents souches (clones naturels), leur identification dans les différents hôtes possibles, vecteurs, mammifères sauvages ou domestiques, hommes, permettront l'étude fine des interactions entre cycle sylvestre et cycle domestique dans ces zones. L'analyse isoenzymatique et l'utilisation de sondes d'ADN kinétoplastique spécifiques des souches de *Trypanosoma cruzi* permettront d'évaluer les risques réels d'établissement de cycles domestiques de la maladie de Chagas dans ces zones de forte colonisation actuellement considérées comme non endémiques. Elles permettront également d'étudier les propriétés épidémiologiques des souches de cycle sylvestre (spécificité d'hôte, pathogénicité), leur structure génétique (mode de reproduction) ainsi que leur dynamique de transmission et propagation.

Summary

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi is the agent of Chagas' disease or latino-american trypanosomiasis, which is a major public health problem in Bolivia. The transmission cycle is mainly domestic, but selvatic cycles in Bolivian subandin colonisation areas have been noted and emerging domestic transmission deserves consideration in these regions. The *Trypanosoma cruzi* selvatic strains (natural clones) appeared genetically different from those of domestic cycle, but further studies are needed. Genetic properties of these strains, their identification in various hosts (vectors, wild or domestic mammals, humans) are required for the understanding of interactions between domestic and selvatic cycles. Isoenzymatic analysis and clone-specific kDNA probes tools will provide important data of the overlap of both cycles (selvatic and domestic) as well as risk of extension of the endemia in these regions. The epidemiological properties of the selvatic strains (host specificity, pathogenicity), the genetic structure and transmission dynamic will also be analysed.

Justification des travaux

La maladie de Chagas touche actuellement 16 à 18 millions de personnes, 500 mille personnes par an sont nouvellement infectées et 90 millions constituent un groupe à risque (TDR, 1991). Cette maladie est un problème majeur de santé en Bolivie puisque environ 30% de la population est infectée par *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), l'agent de cette maladie. Les pathologies développées sont particulièrement graves, tant au niveau cardiaque qu'au niveau digestif (1). *Triatoma infestans* est le principal vecteur identifié responsable de la transmission en cycle domestique. De nouvelles zones retiennent actuellement notre attention. Il s'agit des régions basses (Alto-Beni) où les populations des plateaux affluent de plus en plus depuis 1980 avec la fermeture des mines. Un cycle de transmission sylvestre du parasite y est connu. Un des vecteurs actuellement identifié, *Rhodnius pictipes* a été retrouvé dans des habitations (2) mais aucune étude ne permet actuellement de savoir quelle est la situation de la maladie de Chagas dans ces régions et quel risque est encouru par les populations. D'autre part la politique de colonisation des terres fertiles dans ces régions attire des populations venant de nombreuses régions de Bolivie déjà endémiques pour la maladie de Chagas. Ces populations sont ainsi capables d'introduire des souches de parasites provenant de cycle domestique des autres régions.

Position actuelle du sujet

I. Situation épidémiologique en Bolivie

Dans l'Alto-Beni, *Triatoma infestans*, vecteur essentiellement domestique, responsable de l'endémie en Bolivie, n'est pas connu. Toutefois plusieurs vecteurs généralement sylvestres ont été signalés : *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*. *Rhodnius pictipes* a été trouvé infecté dans des habitations (2) et signalé en assez grande densité en cycle péri-domestique par un chercheur bolivien de l'IBBA. Quelques souches de Trypanosomatidés ont été isolées de ce vecteur ainsi que de quelques mammifères sauvages boliviens, et caractérisées comme *Trypanosoma cruzi* (2,3). Ces souches seraient en général génétiquement différentes de celles retrouvées en cycle domestique en Bolivie (4,5). Cependant, aucune étude ne permet actuellement de savoir quelle est la situation de la maladie de Chagas dans ces régions et quel risque est encouru par les populations.

II. La variabilité génétique de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi est un ensemble de populations génétiquement très hétérogène. De plus, le mode de reproduction et de propagation de ce parasite dans la nature est essentiellement clonal (4). Ces clones parfois génétiquement très différents peuvent coexister dans un

même hôte (vecteur ou homme) comme c'est le cas en Bolivie (1,6). Des résultats préliminaires permettent de penser qu'ils diffèrent radicalement entre eux quant à leurs propriétés médicales (virulence, résistance aux drogues) (7). Il est donc important d'étudier leur répartition dans les cycles naturels. Les quelques souches de *Trypanosoma cruzi* provenant du cycle sylvestre en Bolivie, caractérisées par étude isoenzymatique semblent différentes des nombreux clones provenant de cycles domestiques (1,2,4). Les propriétés génétiques de ces différents clones et leur identification dans les différents hôtes possibles (vecteurs, mammifères sauvages ou domestiques, hommes) permettront l'étude fine des interactions entre cycle sylvestre et cycle domestique dans ces zones. Nous avons au cours de notre DEA étudié la variabilité génétique de stocks de *Trypanosoma cruzi* isolés de vecteurs et de mammifères sauvages en Guyane Française. La variabilité de ces stocks étudiés par électrophorèse d'isoenzymes, est particulièrement importante. De nombreux zymodèmes ont été identifiés. L'ensemble de la population n'est pas panmictique ce qui serait en faveur d'une structure clonale. Cependant, les tests statistiques de recombinaison deviennent négatifs dans certains cas (certaines régions ou certains hôtes). Ces résultats, ainsi que l'énorme diversité génotypique observée, suggèrent que des échanges génétiques occasionnels modulent à l'échelle évolutive la structure clonale prépondérante des populations naturelles du parasite. Ces données préliminaires sont cependant basées sur des petits échantillons. Cette même approche sera appliquée en Bolivie au cours de ce projet.

III. Sondes spécifiques des clones de *Trypanosoma cruzi*

Dernièrement, dans le laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs de Montpellier, une sonde d'ADN spécifique de l'ensemble du taxon *Trypanosoma cruzi* a été développée (publication en préparation). D'autre part, il a été montré que les parties hypervariables de l'ADN des minicercles du kinétoplaste sont spécifiques des clones ou de familles de clones génétiquement apparentées (caractérisés par étude isoenzymatique multilocus) (8,9). L'association de la technique de Polymérisation en chaîne (production en quantité importante de certains fragments d'ADN choisis) avec celle d'hybridation après marquage non radioactif de l'ADN permet la caractérisation des souches (clones naturels) de *Trypanosoma cruzi* directement dans des échantillons biologiques (10). Les dernières mises au point techniques permettent d'identifier directement (sans isolement des souches *in vitro*) les clones qui circulent dans les insectes vecteurs ainsi que dans le sang de personnes infectées. Pour ce dernier point, la sensibilité de la technique est suffisante pour faire le diagnostic de clones chez des patients en phase aiguë de l'infection, et chez une partie au moins des patients en phase chronique. Ces techniques ont été développées pour des études de terrain (marquages non radioactifs).

Description du projet

I. Objectif

Etude de l'interface cycle sylvestre-cycle domestique en Alto-Beni Bolivien : caractérisation des clones de *Trypanosoma cruzi* par analyse isoenzymatique et sondes d'ADN. Cette étude permettra d'évaluer les risques réels d'établissement de cycle domestique de la maladie de Chagas dans ces zones de forte colonisation, actuellement considérées comme non endémiques. Elle permettra également d'étudier les propriétés épidémiologiques des souches de cycle sylvestre (spécificité d'hôte, pathogénicité), leur structure génétique (mode de reproduction) ainsi que leur dynamique de transmission et propagation.

II. Programme

1. Sélection de la zone d'étude

Un transect réalisé le long des principales zones de colonisation des régions subandines hautes (Yungas) vers les régions subandines basses (Alto-Beni) permettra de sélectionner une zone limitée à un ou quelques villages proches. La sélection sera basée : (i) sur les espèces vectorielles rencontrées, (ii) les taux d'infection mesurés chez ces vecteurs récoltés dans le périmètre domestique et péri-domestique et (iii) sur la prévalence sérologique de l'infection par *Trypanosoma cruzi* de toutes les classes d'âge de la population (enfants et adultes).

1.1. Vecteurs

Les habitations seront systématiquement visitées ainsi que l'environnement proche. Les vecteurs récoltés séparément seront ramenés à l'IBBA et leurs fécès examinés au microscope. Les souches des triatomés infectés seront isolées au laboratoire sur milieu NNN.

1.2. Enquête sérologique

Le diagnostic sérologique sera réalisé à l'aide de deux techniques (IF et ELISA) exécutées en routine à l'IBBA (11).

2. Etude du cycle sylvestre

2.1. Etude isoenzymatique

Cette étude consistera à isoler des souches de Trypanosomatidés à partir de vecteurs capturés dans la forêt (en particulier recherche active dans les palmiers) et de mammifères sauvages . Deux procédés d'isolement seront appliqués aux mammifères : le xénodiagnostic effectué de préférence avec le vecteur local, et l'hémoculture. Les souches isolées seront cultivées en milieu LIT au laboratoire et caractérisées par étude isoenzymatique en utilisant 18 systèmes.

2.2. Développement de sondes d'ADN

Des sondes kinétoplastiques des différents clones identifiés seront développées par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) décrite par Veas *et al.* (8,9). Ces sondes permettront une identification plus rapide dans les vecteurs et une meilleure évaluation des mélanges naturels de clones.

3. Etude du cycle domestique

Elle consistera à isoler des souches de l'homme et des mammifères domestiques (chien, cobayes essentiellement) par xénodiagnostic et hémoculture. En parallèle, la technique de PCR sera appliquée à des échantillons de sang afin d'amplifier l'ADN des parties variables des minicercles du kinétoplaste de *T. cruzi*. Ces fragments spécifiques des clones seront alors caractérisés par hybridation (8,9,10). Les résultats seront confrontés à ceux de l'analyse isoenzymatique.

4. Analyse des résultats

4.1. Etude isoenzymatique

L'approche isoenzymatique multilocus proposée par Tibayrenc *et al.* (12,13) pour l'étude des populations naturelles nous permettra de définir la structure des population sylvestres de *T. cruzi* (mode de reproduction) ainsi que leurs relations phylogéniques (mesure de la diversité génétique). Les nombreux tests statistiques à appliquer à notre échantillonnage seront effectués pendant notre troisième année de travail à Montpellier dans le Laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs.

4.2. Prévalence des clones identifiés dans les différents hôtes

Les résultats isoenzymatiques et ceux des caractérisations effectuées à l'aide des sondes permettront d'évaluer les taux respectifs des différents clones dans les différents hôtes ainsi que ceux des mélanges de clones. Ces taux pourront être statistiquement comparés par des tests classiques ainsi que par des indices de structuration appliqués entre les populations infectant les différents hôtes (Nei, Cockerham) (13,14). Cette partie de l'étude sera également réalisée ultérieurement à Montpellier au cours de notre troisième année d'étude.

III. Intérêt du travail et conséquences

1. Intérêts scientifiques

- Meilleure connaissance de la génétique des populations sylvestres de *Trypanosoma cruzi*.
- Caractéristiques épidémiologiques des populations sylvestres de *Trypanosoma cruzi*, spécificité d'hôte, capacité d'infectivité de l'homme.
- Interactions cycle sylvestre-cycle domestique, circulation des populations de *Trypanosoma cruzi* d'un cycle à l'autre.

2. Intérêts pour le développement

- Evaluation des risques de développement de la maladie de Chagas en région subandine basse
- L'étude des interactions entre cycles domestiques et cycles sylvestres peut servir de modèle au problème de réinfestation par des vecteurs sylvestres après des campagnes de fumigation, observées actuellement au Brésil.

Collaborations possibles avec d'autres chercheurs

- Dr. Roxana Carrasco
Département de Parasitologie (IBBA)
Etude de la réponse immune chez l'homme
- Dr. Gerardo Antezana et Dr Octavio Aparicio
Département de cardiologie (IBBA)
Etude de la pathologie cardiaque humaine

- Dr Jean-Pierre Dujardin
 Laboratoire de Génétique des Parasites et des Vecteurs
 ORSTOM Montpellier
 Etude Génétique de *Rhodnius* (Programme TDR ID 910198).

Bibliographie

1. Brenière, S.F., Carrasco, R., Revollo, S., Aparicio, G., Desjeux, P., Tibayrenc, M. (1989) Chagas' disease in Bolivia : Clinical and epidemiological features and zymodemes variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. Am. J. Trop. Med. Hyg., 41 : 521-529.
2. Tibayrenc, M. & Le Pont F. (1984) Etudes isoenzymatiques d'isolats boliviens de *Trypanosoma cruzi* pratiqués chez *Rhodnius pictipes*. Données préliminaires sur la transmission de la maladie de Chagas dans l'Alto Beni bolivien. Cah. ORSTOM Sér. Ent. méd. Parasitol., vol. XXII, 1: 55-57.
3. Valette, E., Brenière, S.F., Le Pont, F., Desjeux., P. (1988) Zymodemes of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild mammals in Bolivia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 83 : 139-140.
4. Tibayrenc, M. and Ayala, F.J. (1988) Isozyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution. 42 (2): 277-292.
5. Brenière, S.F., Braquemond, P., Solari, A., Agnèse, 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.
6. Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Salignac, M., Dedet, J.P., Poch, O., Desjeux, P. (1985). New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. Genetica 67 : 223-280.
7. Sanchez, G., Wallace, A., Ollvares, M. Diaz, N. Aguilera, X., Apt, W., Solari, A. (1990) Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* zymodemes. In vitro differentiation of epimastogotes and infectivity of culture metacyclic trypomastigotes to mice. Exp. Parasitol. 71

8. **Veas, F., Cuny, G., Brenière, S.F., Tibayrenc, M.** (1991). Subspecific kDNA probes for major clones of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 48 : 79-82.
9. **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.
10. **Brenière, S.F., Bosseno, M.F., Revollo, S., Rivera, M.T., Carlier, Y., Tibayrenc, M.** (submitted) Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and blood host by PCR amplification.
11. **Brenière, S.F., Carrasco, R., Miguez, H., Lemesre, J.L., Carlier, Y.** (1985) Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas' disease in Bolivian patients. *Trop. Geograph. Med.* 37 : 231-238.
12. **Tibayrenc, M., Kjellberg, F., 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. USA*, 87: 2414-2418.
13. **Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenière, S.F., Dardé, M.L., Ayala, F.** (1991) Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5129-5133.
14. **Nei, M.** (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 :3321-3323.
15. **Cockerham, C.C.** (1973) Analyses of gene frequencies. *Genetics* 74 : 679-700.