

**GÉNÉTIQUE.** — Les souches isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi* : origine récente ou ancienne, homogène ou hétérogène?

Note de Michel Tibayrenc, Michel Solignac, Marie-Louise Cariou, Dominique Le Ray et Philippe Desjeux, présentée par Pierre-Paul Grassé.

Remise le 16 janvier 1984, acceptée le 14 mai 1984.

La variabilité génétique, étudiée dans 13 stocks de référence de laboratoire de *Trypanosoma cruzi* confirme l'existence de trois catégories isoenzymatiques principales. Il semble désormais possible de rattacher tout stock au taxon *T. cruzi* avec certitude, la majeure partie de la variabilité enzymatique ayant été reconnue.

Les paramètres génétiques permettent d'inférer deux hypothèses majeures quant à l'origine évolutive de ces catégories : origine ancienne (soit par évolution mitotique, soit par spéciation) ou récente (par tirage de clones au sein d'une population ancestrale sexuée). L'éventualité d'une origine hétérogène des souches est évoquée.

**GENETICS.** — *Trypanosoma Cruzii* Isozymic Strains: Recent or Ancient, Homogeneous or Heterogeneous Origin?

*Genetic variability studied among 13 Trypanosoma cruzi laboratory reference stocks confirms the existence of three principal isozymic categories. As the main part of enzymic variability is now recognized, it seems possible to attribute any stock to the taxon T. cruzi with safety. Genetic parameters allow to infer two main hypotheses relative to the evolutionary origin of these categories: ancient origin (either by mitotic evolution or by speciation), or recent origin (by clone sampling among a sexual ancestral population). The possibility of a heterogeneous origin of the strains is discussed.*

Les études isoenzymatiques de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas, commencées dès 1974 [1], ont permis, sur la base d'une interprétation intuitive des électrophorogrammes, de distinguer des souches isoenzymatiques [2] et de les classer par taxinomie numérique [3]. Plus récemment, l'interprétation génétique des zymogrammes nous a conduits aux inférences suivantes : le génome de *T. cruzi* est diploïde ([4], voir aussi [5]); il n'existe à l'heure actuelle aucune trace de sexualité mendélienne chez cet organisme [6]; enfin, les souches peuvent être regroupées en trois catégories principales en fonction de leur distance génétique ([7]-[10]). Le problème qui se pose maintenant, déjà soulevé dans un précédent travail [9], concerne l'origine évolutive des souches ainsi définies. Dans la présente étude, après avoir examiné les principaux stocks de référence utilisés dans de nombreux laboratoires (tableau I), nous proposons une classification de ces souches et considérons les principales hypothèses susceptibles de rendre compte de leur origine.

Les méthodes de culture du parasite ainsi que les techniques d'électrophorèse et de révélation des activités enzymatiques ont été décrites par ailleurs ([11], [12]). Les fonctions enzymatiques étudiées sont énumérées dans le tableau II.

Sur les 13 stocks étudiés, 9 catégories génotypiques ont été reconnues (tableau II). Si l'on considère les stocks dans leur ensemble, les génotypes inférés permettent de calculer les paramètres génétiques suivants : pourcentage de locus polymorphes : 93 %; nombre moyen d'allèles par locus : 3,7; hétérozygotie observée : 0,10; hétérozygotie calculée (en considérant qu'il y a autant de génotypes que de clones différents) : 0,59; distances génétiques allant de 0,06 à 2,62 (tableau III). Le dendrogramme construit à partir de la matrice des distances génétiques (fig) montre clairement trois catégories principales de souches isoenzymatiques séparées par de fortes distances génétiques. Les catégories 1 et 2 sont divisées en sous-catégories séparées par des distances génétiques nettement plus faibles. La catégorie 3 n'est représentée que par un seul stock. Ces résultats recourent ceux que nous avons obtenus précédemment ([9], [10]). Ceci permet de supposer qu'à

TABLEAU I

Liste des stocks avec leur provenance et leur classification isoenzymatique (voir dendrogramme). Les références telles que 1a, 1b, et 1c n'ont pas été données car elles ont déjà été attribuées à d'autres souches isoenzymatiques [9].

List of the stocks with their origin and isoenzymic classification (references such as 1a, 1b and 1c were not assigned because they were yet used for other isoenzymic strains [9]).

| Stocks                         | Origine | Classification isoenzymatique |
|--------------------------------|---------|-------------------------------|
| C8cl1. ....                    | Bolivie | 1                             |
| WA250 (Zymodème 1). ....       | Brésil  | 1                             |
| Tehuentepec. ....              | Mexique | 1 e                           |
| ITMAP943 (Aotus). ....         | Brésil  | 1 f                           |
| Sc43cl1. ....                  | Bolivie | 2                             |
| Tulahuen (clone FK 11 A). .... | Chili   | 2 a                           |
| ITMAP240. ....                 | Brésil  | 2 a                           |
| Maryland. ....                 | USA     | 2 a                           |
| CL. ....                       | Brésil  | 2 a                           |
| tu 107. ....                   | Bolivie | 2 c                           |
| Y. ....                        | Brésil  | 2 d                           |
| Esmereldo (Zymodème 2). ....   | Brésil  | 2 e                           |
| Can AIII (Zymodème 3). ....    | Brésil  | 3                             |

présent la plus grande partie de la variabilité isoenzymatique de *T. cruzi* a été reconnue, d'autant plus que les stocks étudiés ici recouvrent une très vaste aire géographique.

Dans une précédente Note [9], nous avons considéré le problème de l'origine évolutive des souches sous l'angle de la reproduction sexuée. Dans la présente étude, nous examinons la question de l'ancienneté de l'origine des souches. On peut d'abord inférer que les grandes distances génétiques observées entre les souches principales sont un reflet direct du temps de séparation entre ces souches. Dans ce cas, on peut proposer deux hypothèses sur leur origine (voir [9]) : évolution mitotique prépondérante (hypothèse A), ou spéciation vraie, au sens biologique du terme, à l'origine des trois souches principales, avec perte récente de la sexualité (hypothèse B). Dans le cadre de l'hypothèse A, on s'explique mal l'absence d'une forte hétérozygotie, telle qu'on l'attendrait chez un organisme diploïde à reproduction asexuée ([13], [14]). L'hypothèse B est plus compatible avec les observations et permet de rendre compte en partie des états homozygotes alternatifs sans hétérozygotes correspondants.

TABLEAU II

Enzymes étudiées et génotypes des différentes souches. Pour chaque enzyme, l'allèle 1 présente la plus grande mobilité électrophorétique. (1) substrat=L-leucyl-leucyl-leucine. (2) substrat=L-leucyl-L-alanine. (3) substrat=L-leucyl- $\beta$ -naphtylamide.

Enzymes used and genotypes. For each locus, the alleles are named according to their relative mobility, allele 1 being the fastest.

| Enzyme                     | Souche isoenzymatique |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                            | 1                     | 1 e | 1 f | 2   | 2 a | 2 c | 2 d | 2 e | 3   |
| PGM (EC. 2751). ....       | 1/1                   | 1/1 | 1/1 | 2/5 | 2/5 | 4/6 | 5/5 | 5/5 | 3/3 |
| GPI (EC. 5319). ....       | 6/6                   | 6/6 | 6/6 | 2/5 | 3/5 | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 4/4 |
| 6 PGD (EC. 11144). ....    | 3/3                   | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 1/3 | 1/1 | 1/1 | 2/2 | 4/4 |
| ICD (EC. 11142). ....      | 1/2                   | 1/2 | 1/2 | 3/4 | 3/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 3/3 |
| G 6 PD (EC. 11149). ....   | 4/4                   | 4/4 | 4/4 | 3/3 | 3/3 | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 5/5 |
| ME 1 (EC. 11140). ....     | 3/3                   | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 2/2 |
| ME 2 (EC. 11140). ....     | 2/2                   | 2/2 | 4/4 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1/1 |
| MDH 1 (EC. 11137). ....    | 2/2                   | 2/2 | 2/2 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 3/3 |
| MDH 2 (EC. 11137). ....    | 1/1                   | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
| GDNad (EC. 1212). ....     | 3/3                   | 3/3 | 3/3 | 1/1 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 |
| GDNadp (EC. 1412). ....    | 1/1                   | 1/1 | 1/1 | 2/2 | 2/2 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 4/4 |
| PEPA (1) (EC. 3411). ....  | 1/1                   | 1/1 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 4/4 | 4/4 | 2/2 | 5/5 |
| PEPB (2) (EC. 3411). ....  | 1/1                   | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 2/2 |
| LAP (3) (E. C. 3411). .... | 1/1                   | 1/1 | 1/1 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 2/2 | 3/3 |

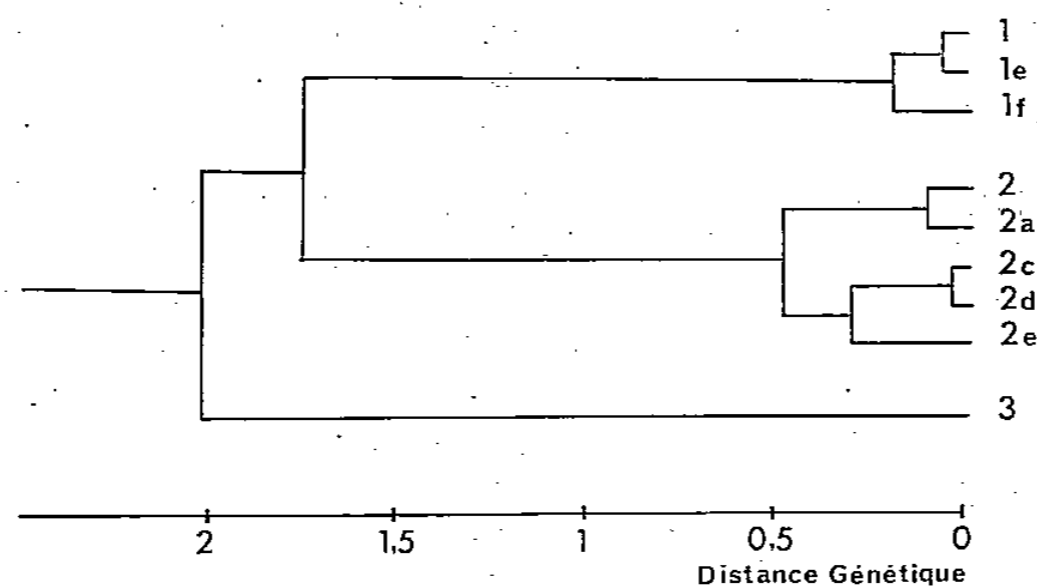
TABLEAU III

Matrice des distances génétiques (identités génétiques au-dessus de la diagonale).  
 Matrix of genetic distances (above the diagonal, genetic similarity).

|     | 1    | 1 e  | 1 f  | 2    | 2 a  | 2 c  | 2 d  | 2 e  | 3    |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1   | —    | 0,92 | 0,78 | 0,20 | 0,20 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,07 |
| 1 e | 0,08 | —    | 0,85 | 0,20 | 0,20 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| 1 f | 0,25 | 0,16 | —    | 0,28 | 0,28 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| 2   | 1,63 | 1,63 | 1,29 | —    | 0,90 | 0,55 | 0,58 | 0,55 | 0,17 |
| 2 a | 1,63 | 1,63 | 1,29 | 0,11 | —    | 0,67 | 0,69 | 0,65 | 0,19 |
| 2 c | 1,91 | 1,91 | 1,91 | 0,60 | 0,40 | —    | 0,95 | 0,70 | 0,15 |
| 2 d | 1,93 | 1,93 | 1,93 | 0,55 | 0,37 | 0,06 | —    | 0,76 | 0,14 |
| 2 e | 1,91 | 1,91 | 1,91 | 0,60 | 0,43 | 0,35 | 0,27 | —    | 0,15 |
| 3   | 2,62 | 1,93 | 1,93 | 2,16 | 1,65 | 1,93 | 1,95 | 1,93 | —    |

Du point de vue de l'ancienneté de l'origine des souches, on peut envisager une toute autre éventualité (hypothèse C) : cette origine pourrait être récente, voire très récente, par tirage aléatoire de clones génotypiquement très différents au sein du pool génique d'un ancêtre commun sexué, et perte concomitante de la sexualité. Une telle production de clones a été observée chez des blattes parthénogénétiques [15]. Selon cette hypothèse, les fortes distances génétiques observées entre les souches de *T. cruzi* n'auraient alors aucune signification quant au temps évolutif. Depuis la date d'individualisation de ces clones, la majeure partie se serait éteinte. En effet, une dizaine seulement a été détectée à l'heure actuelle; une telle situation est considérée comme fréquente chez les animaux à reproduction clonale [16]. Pour expliquer les fortes distances génétiques observées, il faudrait supposer une énorme variabilité génétique de la population sexuée originelle. Il existe enfin une contradiction interne à cette hypothèse, du fait que l'hétérozygotie moyenne *par individu* ( $H_I=0,10$ ) est notablement inférieure à l'hétérozygotie *calculée* moyenne *par locus* ( $H_L=0,59$ ) alors que ces deux moyennes sont attendues identiques. Les états homozygotes alternatifs sont compatibles avec cette hypothèse mais la grande majorité des génotypes hétérozygotes attendus est absente. L'existence éventuelle chez *T. cruzi* de phénomènes tels que la conversion ou la recombinaison somatique serait susceptible de lever partiellement ces contradictions.

Les trois hypothèses présentent certaines contradictions avec les données génétiques. Cependant, l'hypothèse B (spéciation ancienne) est celle qui rend compte le plus facilement des faits observés, l'hypothèse A soulevant le maximum de contradictions. L'analyse



Dendrogramme établi à partir des distances génétiques par la méthode de branchement UPGMA.

Dendrogram established from genetic using UPGMA cluster method.

comparée des autres propriétés du parasite (par exemple pharmacologie, pathogénie, ADN kinétoplastique), donnera des éléments pour éprouver A et B par rapport à C. En effet, dans le cas d'une origine ancienne, les autres propriétés du parasite considérées dans leur ensemble devraient être corrélées aux distances génétiques. Autrement dit, les sous-clones devraient davantage se ressembler que les clones principaux. Par contre, si les distances génétiques n'ont pas de rapport avec le temps évolutif (C), les autres propriétés du parasite n'ont aucune raison de leur être corrélées.

On doit enfin garder à l'esprit la possibilité d'une origine hétérogène du taxon *T. cruzi*. Il est possible par exemple que le groupe 3 soit d'une toute autre origine que les groupes 1 et 2 : des observations épidémiologiques et morphologiques plaident en ce sens. Là aussi, l'analyse comparée des différentes propriétés du parasite pourra apporter des éléments de réponse.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P. J. TOYE, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68, 1974, p. 147.
- [2] M. A. MILES et coll., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71, 1977, p. 217-225.
- [3] P. D. READY et M. A. MILES, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74, 1980, p. 238-242.
- [4] M. TIBAYRENC et coll., *Comptes rendus*, 292, série III, 1981, p. 623-625.
- [5] D. E. LANAR et coll., *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 1981, p. 327-341.
- [6] M. TIBAYRENC et coll., *Comptes rendus*, 293, série III, 1981, p. 207-209.
- [7] M. NEI, *Amer. Nat.*, 106, 1972, p. 283-292.
- [8] M. TIBAYRENC, *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Ent. Méd. Parasitol.*, 18, 1980, p. 301-302.
- [9] M. TIBAYRENC et coll., *Comptes rendus*, 296, série III, 1983, p. 721-726.
- [10] M. TIBAYRENC et M. A. MILES, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77, 1983, p. 76-83.
- [11] M. TIBAYRENC et D. LE RAY, *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, (soumis pour publication).
- [12] M. TIBAYRENC et coll., *Cah. O.R.S.T.O.M. Sér. Méd. Parasitol.*, 21, 1983, p. 35-45.
- [13] J. GENERMONT, *Mém. Soc. Zool. Fr.*, 40, 1980, p. 287-320.
- [14] L. LOKKI, *Hereditas*, 83, 1976, p. 57-64.
- [15] E. D. PARKER et coll., *Evol.*, 31, 1977, p. 836-842.
- [16] J. T. MANNING, *Heredity*, 30, 1983, p. 15-19.

M. T. : O.R.S.T.O.M., I.B.B.A., Embajada de Francia, Casilla 824, La Paz, Bolivia;  
 M.-L. C. et M. S. : Laboratoire de Biologie et Génétique évolutives, C.N.R.S., 91190, Gif-sur-Yvette;  
 D. L. R. : Institut de Médecine tropicale Prince-Léopold, 155, Nationalestraat, B-2000 Antwerpen, Belgique;  
 et P. D. : Institut Pasteur, Paris et I.B.B.A.