

Données isoenzymatiques pour onze souches boliviennes de *Trypanosoma cruzi*. Interprétation génétique et calcul de distances ⁽¹⁾

Michel TIBAYRENC*
Frédérique BRENIERE**
Lourdes ECHALAR**
Yves CARLIER***

Résumé

Les auteurs décrivent le profil isoenzymatique de 11 souches boliviennes de *Trypanosoma cruzi* pour 10 enzymes, par rapport à des cultures standard de référence. Ils tentent une interprétation génétique de ces zymogrammes, et proposent un premier calcul de distance génétique pour 3 souches.

Mots-clés : *Trypanosoma cruzi* – Bolivie – Zymogrammes – Interprétation génétique.

Summary

ENZYMATIC DATA FOR ELEVEN BOLIVIAN STRAINS OF *TRYPANOSOMA CRUZI*. GENETIC INTERPRETATION AND ESTIMATION OF GENETIC DISTANCE

The authors describe enzymatic type of 11 bolivian strains of *Trypanosoma cruzi* for 10 enzymes with regard to reference standard cultures. They try to give a genetic interpretation of these zymograms, and propose a first estimation of genetic distance for 3 strains.

Key words : *Trypanosoma cruzi* – Bolivia – Zymograms – Genetic interpretation.

L'approche génétique des zymogrammes de flagellés (Tibayrenc, Cariou et Solignac, sous presse) permet non seulement de typer les souches, mais encore de les comparer entre elles, d'élucider leurs liens de parenté. Dans cet article, nous donnons les premiers résultats expérimentaux pour 11 souches boliviennes de *Trypanosoma cruzi* isolées à partir de triatomés récoltés en des points variés du territoire bolivien.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prélèvement et culture des trypanosomes

Après examen des triatomés (tous appartenant à l'espèce majoritaire en Bolivie : *Triatoma infestans*) pour sélectionner les sujets infestés, on a procédé au prélèvement des souches comme suit : dissection du

(1) Travail réalisé avec l'aide de la Coopération Technique Française (Ministère des Affaires Étrangères) et l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique : n° d'aide DIF/TVD/79 n° 70486.

* Entomologiste médical ORSTOM.

** Assistantes de recherche I.B.B.A.

*** Co-directeur I.B.B.A.

Adresse actuelle : Instituto Boliviano de Biología de Altura (I.B.B.A.), Embajada de Francia, Casilla 824, La Paz, Bolivia.

tube digestif complet à l'aide d'instruments stériles, ensemencement en tube de milieu GLSH. Les cultures ont été repiquées selon un rythme dépendant de leur cinétique. Quand la multiplication a été satisfaisante, on les a passées en flacons contenant 40 ml de milieu, puis 200 ml, puis 1 l. Chaque souche a d'autre part été passée sur souris par injection intrapéritonéale de culture, ou de broyat de tube digestif de triatome infecté. Quand la parasitémie a été suffisante (1 mois environ), on a repiqué en milieu GLSH en prélevant le sang de la souris par ponction intracardiaque. En vue des électrophorèses, les trypanosomes ont été récoltés par triple centrifugation de 10 minutes à

3 000 G, et double lavage au liquide de Hans Wallace. Le culot obtenu a été additionné d'une quantité égale de liquide hypotonique stabilisateur d'enzyme (dithio-treitol 0,2M, acide E aminocaproïque 0,2M, EDTA 0,2M) et laissé sur un lit de glace pendant 20 minutes. L'extrait obtenu a été réparti en doses de 15 microlitres, refroidi instantanément par immersion dans l'azote liquide, et stocké à -70° .

Provenance des souches

Elle est donnée par le tableau I.

TABLEAU I
Provenance des souches étudiées

Désignation	Nom de lieu	Région	Altitude	Type de gîte
1	Bario lindo	Camiri, 300 km sud de Santa Cruz	400 m	Domiciliaire
2	Gararapo	—	—	Péridomicil.
3	Lagunilla	—	—	Domiciliaire
4	Tachiperenda	—	—	—
5	Sallani	Sapahaqui, 60 km sud de La Paz	2 600 m	Péridomicil.
6	Pabellon 1	—	—	—
7	Pabellon 2	—	—	—
8	Pabellon 3	—	—	—
9	Pabellon 4	—	—	—
10	Pabellon 5	—	—	—
11	Trinidad Pampa	Coripata, 120 km est de La Paz	1 700 m	—

A = *Leishmania brasiliensis brasiliensis* provenant de l'Institut Prince Léopold d'Anvers.
B = *Trypanosoma rangeli* de l'Institut Pasteur de Lille.
C = *Trypanosoma cruzi* de l'Institut Pasteur de Lille.

Méthode électrophorétique employée

On a utilisé comme support l'acétate de cellulose (matériel HELENA). Chaque plaque peut porter 8 échantillons différents, et le bac contient 3 plaques. Les 10 enzymes employées ici (phosphoglucomutase, malate déshydrogénase NAD dépendante, malate déshydrogénase NADP dépendante ou « malic enzyme », isocitrate déshydrogénase, glutamate déshydrogénase NAD dépendante, glutamate déshydrogénase NADP dépendante, lactate déshydrogénase, glucose 6 phosphate déshydrogénase, 6 phosphogluconate déshydrogénase, phosphogluucose isomérase) peuvent être révélées avec 10 à 15 microlitres de l'extrait de trypanosome (le produit d'un seul tube de culture). Ceci est précieux pour les laboratoires qui ne sont pas équipés pour les cultures massives. Les migrations prennent 10 à 15 minutes. La révélation des plaques se fait en 30 minutes au plus. Les échantillons se conservent à sec dans un classeur. Pour les enzymes PGM, G6PD, 6PGD et PGI, on a utilisé sans les modifier les techniques préconisées par Kreutzer et Christensen (1980). Pour MDH et ME, la solution de révélation a été modifiée (tampon tris malique concentré : Tris : 1,5 g ; acide malique : 10 g ; eau distillée : 250 ml, ajustement du ph à 7). Les 2 GDH ont fait appel à un tampon tris glutamique ainsi composé : Tris : 1,5 g ; acide glutamique : 15 g ; eau distillée : 250 ml ; ajuster le ph à 7. Pour ces 2 enzymes, le tampon de migration utilisé a été le n° III de Shaw et Prasad (1970). LDH a été révélée en modifiant le kit commercialisé par HELENA (2 flacons dilués chacun dans 1,5 ml d'eau distillée, mélangés à 5 ml d'agarose à 2 % chauffé à 50°). Le tampon de migration utilisé a été celui que commercialise HELENA (HR dilué à 1 750 ml d'eau distillée). IDH a été adaptée de Shaw et Prasad (1970) avec leur tampon de migration n° XIV.

RÉSULTATS

Certaines enzymes apparaissent monomorphes, d'autres sont variables. C'est cette variabilité qui nous a permis de formuler des hypothèses sur la commande génétique des isoenzymes de trypanosomes.

— PGM : la souche de référence C (Lille) montre une bande unique, migrant à 25 mm de l'origine. Les souches boliviennes 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 montrent le même type que C. Les souches 4 et 5 ont une double bande (migration 24 et 23 mm de l'origine) (photo 1).

Ces 2 types rappellent ceux qu'expose Godfrey (1979). La souche de référence B (*Trypanosoma rangeli*) montre une bande unique à 31. La souche de référence A (*Leishmania brasiliensis brasiliensis*) donne une

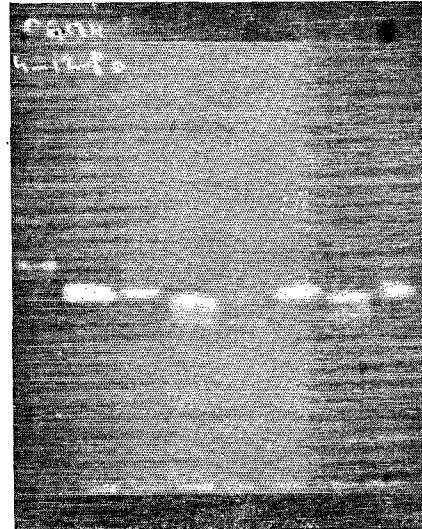


PHOTO 1. — Zymogramme de *Trypanosoma* pour l'enzyme phosphoglucomutase (en négatif). De gauche à droite : *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi*, Institut Pasteur de Lille (souche C), souches boliviennes *T. cruzi* nos 10, 5, 4, 1, 5 et 2.

bande à 33. L'intensité des bandes est assez uniforme d'un échantillon à l'autre. Les doubles bandes sont plus ténues que les simples. La révélation est satisfaisante en une demi-heure.

— MDH : C a 2 bandes éloignées l'une de l'autre (13 et 5). Toutes les souches boliviennes répondent à ce type, sauf 10 qui ne s'est pas révélée. B (*T. rangeli*) a une seule bande à 10 mm. A n'a pas été testée. — ME : l'aspect rappelle celui de la MDH. C a 2 bandes (34 et 19 mm). 1, 2, 3, 6, 8, 9, 11 montrent le même aspect. 4 et 5 ont la même bande rapide à 34 mm, mais leur bande lente ne migre qu'à 16 mm. 7 et 10 n'ont pu être testées. B a une seule bande, toujours très intense et de révélation rapide, à 16 mm. A montre une bande à 30 mm.

— IDH : la révélation de cette enzyme est capricieuse. De plus, la vitesse de révélation diffère d'une souche à l'autre, ce qui oblige à diluer les souches dont l'activité enzymatique est la plus forte (C surtout). C a 2 bandes très proches l'une de l'autre (23 et 21 mm). 1, 2, 3 ont le même aspect. 4 et 6 n'ont que la bande 23. 5 a une seule bande à 19 mm. 7 et B ne se sont pas révélées. 8, 9, 10, 11 et A n'ont pu être testées.

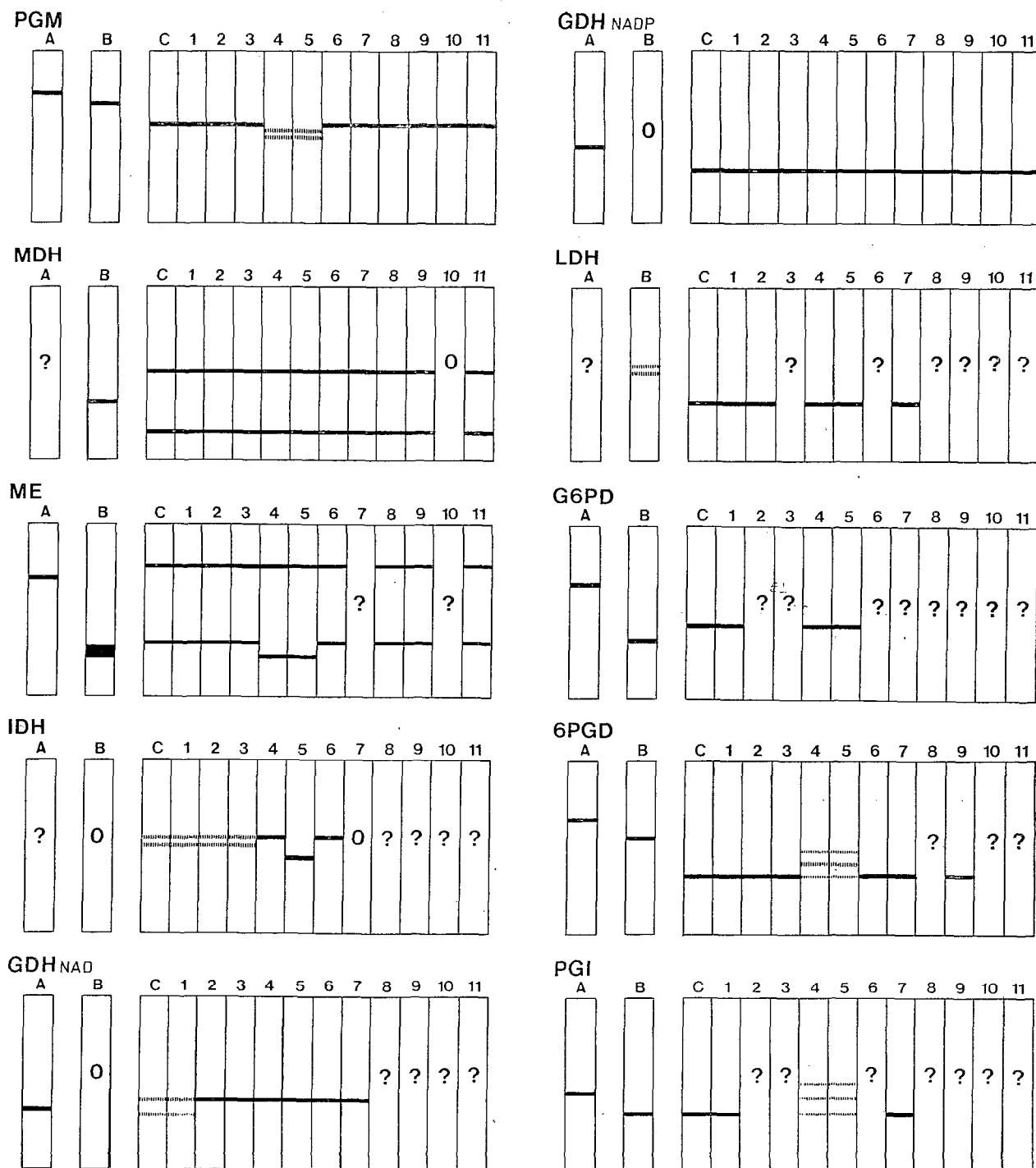


FIG. 1. — Diagrammes.

A = *Leishmania brasiliensis brasiliensis*, Institut Prince-Léopold, Anvers. B = *Trypanosoma rangeli*, Institut Pasteur de Lille. C = *T. cruzi*, Institut Pasteur de Lille. 1 à 11 = souches boliviennes de *T. cruzi*. 0 = enzyme non révélée. ? = enzyme non testée.

DONNÉES ISOENZYMATIQUES POUR ONZE SOUCHES BOLIVIENNES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

— GDH NAD : l'activité de cette enzyme est très faible. Il faut attendre au moins 1/2 h de révélation. L'interprétation des plaques est délicate et doit être étayée par de nombreux essais comparatifs. C et 1 montrent une double bande (16 et 13 mm) sur les plaques les plus nettes, une tache étalée sur d'autres. 2, 3, 4, 5, 6, 7 n'ont que la bande 16. 8, 9, 10, 11 n'ont pu être essayées. B ne s'est pas révélée de façon interprétable. A montre une bande à 14.

— GDH NADP : au contraire, cette enzyme a une très forte activité. La révélation doit être étroitement surveillée, l'intensité des bandes étant souvent suffisante au bout de 5 minutes. C et toutes les souches boliviennes ont une bande unique à 11 mm. B ne s'est pas révélée. A possède une bande à 15.

— LDH : la révélation est très rapide pour *T. cruzi* (moins de 5 minutes). C, 1, 2, 4, 5, 7 ont toutes la même bande, à 10 mm. Les autres souches boliviennes et A n'ont pas été testées. B a une double bande (19 et 16 mm) d'intensité plus faible que la bande unique des *T. cruzi*, et de révélation plus lente (15 à 20 minutes).

— G6PD : cette enzyme n'a pu être essayée qu'une fois. C, 1, 2, 4 et 5 ont toutes la même bande, à 15 mm. Les autres souches boliviennes n'ont pu être essayées. B et A montrent une bande unique, migrant respectivement à 13 et à 21 mm.

— 6PGD : C, 1, 2, 3, 6, 7 et 9 ont une bande à 16 mm. 4 et 5 sont tri-bandes (16, 18 et 20 mm). L'intensité de ces 3 bandes est symétrique (2 bandes extrêmes également intenses, et plus ténues que la bande médiane), 8, 10 et 11 n'ont pu être testées. B et A ont une simple bande (respectivement à 23 et 25 mm).

— PGI : cette enzyme n'a pu être testée qu'une fois. C, 1, 7 et B ont une bande simple à 14 mm. 4 et 5 ont 3 bandes (14, 17 et 21), avec le même aspect symétrique que pour 6PGD. Les autres souches boliviennes n'ont pu être testées. A n'a qu'une bande (19 mm). Pour les *T. cruzi*, les types rappellent ceux que Chance *et al.* (1978) ont observé chez des *Leishmania* pour cette enzyme. Toutes les enzymes, à l'exception de G6PD et de PGI, ont été essayées plusieurs fois : les zymogrammes ne se sont pas modifiés.

DISCUSSION

L'hypothèse que nous avons proposée par ailleurs (Tibayrenc, Cariou et Solignac, sous presse) : structure diploïde des trypanosomes, permet d'interpréter nos zymogrammes de *T. cruzi* comme suit :

2 loci de commande : MDN et ME.

1 seul locus : les autres enzymes.

Loci monomorphes : MDH rapide et lent, ME rapide GDH NADP, LDH, G6PD.

Loci polymorphes : PGM, ME lent, IDH, GDH NAD, 6PGD, PGI.

Enzymes monomères : ce sont celles pour lesquelles les hétérozygotes présumés ont 2 bandes : PGM, IDH et GDH NAD.

Enzymes dimères : celles pour lesquelles les hétérozygotes ont 3 bandes : 6PGD et PGI.

A titre d'exemples, les souches de *T. cruzi* montreraient ici 3 allèles PGM, désignés 1, 2 et 3 par ordre de rapidité décroissante. Les souches C, 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 seraient homozygotes 1/1. Les souches 4 et 5 seraient hétérozygotes 2/3. En ce qui concerne 6PGD, il y aurait 2 allèles 1 et 2. Les souches C, 1, 2, 3, 6, 7 et 9 seraient homozygotes 2/2. Les souches 4 et 5

TABLEAU II

Calcul des distances génétiques pour les souches C, 1, 4 et 5 ; fréquence des allèles

Locus	Allèle	C	1	4	5
PGM.....	1	1	1	0	0
	2	0	0	0,5	0,5
	3	0	0	0,5	0,5
MDH 1...		1	1	1	1
MDH 2...		1	1	1	1
ME 1.....		1	1	1	1
ME 2.....	1	1	1	0	0
	2	0	0	1	1
IDH.....	1	0,5	0,5	1	0
	2	0,5	0,5	0	0
	3	0	0	0	1
GDH nad..	1	0,5	0,5	1	1
	2	0,5	0,5	0	0
GDH nadp.		1	1	1	1
LDH.....		1	1	1	1
G6PD.....		1	1	1	1
6PGD.....	1	0	0	0,5	0,5
	2	1	1	0,5	0,5
PGI.....	1	0	0	0,5	0,5
	2	1	1	0,5	0,5

seraient hétérozygotes 1/2, leur bande intermédiaire étant due à l'action d'une molécule enzymatique hybride (enzyme dimère).

Subjectivement, l'examen des plaques suggère que les souches 4 et 5 sont « très » différentes des autres souches boliviennes, lesquelles paraissent proches de la culture de Lille (C), ou semblables à elle. Le calcul des distances génétiques (Nei, 1972 ; Tibayrenc, 1980) va nous permettre de quantifier ces liens de parenté. Malheureusement, les données ne sont complètes que pour C, 1, 4 et 5. Le détail des calculs est exposé dans le tableau II. Rappelons que les calculs doivent inclure tous les loci étudiés, y compris les monomorphes. La fréquence des allèles est soit 0, soit 0,5 (souches hétérozygotes) soit 1. On obtient les résultats suivants : Distance génétique standard (Ds) entre C et 1 = 0 (souches en tous points identiques).

DsC-4 : 0,30.

DsC-5 : 0,36.

Ds4-5 : 0,10.

Rappelons la signification concrète de la distance génétique entre 2 populations : nombre moyen de codons différents/gène.

Les distances observées sont de l'ordre de celles qu'on rencontre (dans certains cas) chez des insectes entre 2 espèces très apparentées. Mais il est extrêmement hasardeux de chercher à établir des standards de distances qui correspondraient à tel ou tel niveau taxonomique. Même au sein d'un même genre (*Drosophila* par exemple), on observe de grandes disparités. En ce qui concerne les trypanosomes cependant, la distance génétique traduit la même chose que pour les autres animaux : une parenté génique, dont la signification biologique sera appréciée par des travaux ultérieurs.

Nous n'avons pas tenté d'interprétation génétique pour *Leishmania brasiliensis brasiliensis* et *Trypanosoma rangeli*, nos données étant insuffisantes. Notons toutefois que *Leishmania* n'a montré aucun allèle commun avec les *T. cruzi*, et que *T. rangeli* n'en aurait que 2 (ME lente avec les souches 4 et 5, G6PD avec l'allèle lent des *T. cruzi*).

CONCLUSION

Les souches boliviennes confirment la variabilité « intraspécifique » déjà notée pour *T. cruzi* par d'autres auteurs (Miles *et al.*, 1977). L'analyse génétique des zymogrammes peut permettre de quantifier les liens de parenté existant entre les différentes « souches », et de reconsidérer certains points obscurs (taxonomie, existence d'une sexualité).

*Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'ORSTOM,
le 10 mars 1981*

BIBLIOGRAPHIE

- CHANCE (M. L.), SCHNUR (L. F.), THOMAS (S. C.) and PETERS (W.), 1978. — The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the Aethiopian zoogeographical region of Africa. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 72 : 533-542.
- GODFREY (D. G.), 1979. — Biochemical strain characterization of Trypanosomes. Congreso internacional sobre doença de Chagas. Rio de Janeiro, Brasil : 91-97.
- KREUTZER (R. D.) and CHRISTENSEN (H. A.), 1980. — Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 29, 2 : 199-208.
- MILES (M. A.), TOYE (P. J.), OSWALD (S. C.), and GODFREY (D. G.), 1977. — The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independantly in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 71, 3 : 217-225.
- NEI (M.), 1972. — Genetic distance between populations. *Am. Natur.* 106 : 283-292.
- SHAW (C. R.) and PRASAD (R.), 1970. — Starch gel electrophoresis : a compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 4 : 297-320.
- TIBAYRENC (M.), 1980. — Application of the calculations of genetic distance for enzymatic typing of flagellates. Possibility of a natural systematics. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XVIII, n° 3 : 301-302.
- TIBAYRENC (M.), CARIU (M. L.) et SOLIGNAC (M.), 1981. — Interprétation génétique des zymogrammes de Flagellés des genres *Trypanosoma* et *Leishmania*. *Comptes Rendus Acad. Sci.* : sous presse.