



Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération

Centre
de
Montpellier

VALEUR DES MARQUEURS RAPD
(Random amplified polymorphic DNA)
DANS L'ÉTUDE DE LA MICROVARIABILITÉ
D'UN CLONET MAJEUR
DE *TRYPANOSOMA CRUZI*,
AGENT DE LA MALADIE DE CHAGAS

Frédérique TARRIEU

Frédérique TARRIEU

VALEUR DES MARQUEURS RAPD

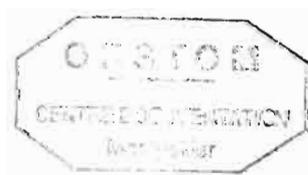
(Random amplified polymorphic DNA)

DANS L'ÉTUDE DE LA MICROVARIABILITÉ D'UN CLONET MAJEUR

DE *TRYPANOSOMA CRUZI*,

AGENT DE LA MALADIE DE CHAGAS

17/03/96



15 MARS 1996

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

Ce travail de recherche a été effectué au sein de l'UMR CNRS-Orstom n° 9926 "Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs" (UR des maladies infectieuses et parasitaires; département Eau et Santé) du centre de recherche Orstom de Montpellier sous la direction du Dr Michel Tibayrenc, directeur de l'UR, pour l'obtention par Frédérique Tarrieu du diplôme d'études approfondies de parasitologie de l'université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier II, le 7 juillet 1994.

**Université des Sciences et Techniques
du Languedoc - Montpellier II**

Diplôme d'Etudes Approfondies de Parasitologie

Mémoire de stage

Année 1993-1994

**Valeur des marqueurs RAPD
(Random Amplified Polymorphic DNA)
dans l'étude de la microvariabilité
d'un clonot majeur de *Trypanosoma cruzi*,
agent de la maladie de Chagas**

soutenu le 7 juillet 1994

par Frédérique Tarrieu

**UMR CNRS-ORSTOM 9926 :
Génétique Moléculaire des Parasites et des Vecteurs
Centre de Recherche ORSTOM de Montpellier
Directeur de stage : Dr. Michel Tibayrenc**

TABLE DES MATIERES

Résumé	2
Abstract	3
I - Introduction	4
II - Généralités	4
2.1 - La maladie de Chagas	4
2.2 - Le parasite	4
2.2.1 - Position taxonomique du genre <i>Trypanosoma</i> (Grüby, 1843)	4
2.2.2 - Morphologie	5
2.2.3 - Cycle évolutif	5
III - Position du problème	5
IV - Matériel et méthodes	7
4.1 - Matériel biologique	7
4.2 - Extraction de l'ADN	7
4.3 - Amplification de l'ADN par amorce aléatoire ou RAPD	7
4.3.1 - Généralités	7
4.3.2 - La technique RAPD	9
4.3.2.1 - Réactifs et matériel	9
4.3.2.2 - Amplification et visualisation des bandes	10
4.4 - Lecture des profils RAPD	10
4.5 - Méthodes d'analyse des résultats	11
4.5.1 - Evaluation et visualisation des distances génétiques	11
4.5.2 - Analyse de génétique des populations	11
V - Résultats	13
5.1 - Profils d'amplification	13
5.2 - Dendrogrammes	16
5.3 - Tests de génétique des populations	16
5.4 - Apport des résultats isoenzymatiques	19
VI - Discussion	19
VII - Conclusion	22
Références bibliographiques	24

I - Introduction

La maladie de Chagas, ou trypanosomiase humaine américaine, est un des problèmes de santé majeurs en Amérique latine. Son agent causal, *Trypanosoma cruzi*, montre un polymorphisme génétique considérable, dont l'origine est encore sujette à controverse. Des données concordantes suggèrent de plus en plus que cette diversité génétique a un impact majeur sur les propriétés médicalement importantes du parasite (virulence, résistance aux drogues). Par ailleurs, ce polymorphisme génétique est mis à profit pour typer les souches et permettre leur suivi au cours d'enquêtes épidémiologiques.

D'un point de vue médical et épidémiologique, il est donc important de mieux cerner les mécanismes qui gouvernent l'apparition et le maintien de la variabilité génétique de l'agent de la maladie de Chagas. Le présent travail a deux buts :

- perfectionner les modèles de génétique des populations actuellement disponibles concernant ce parasite.
- augmenter le niveau de résolution du marquage des souches de *T. cruzi*, de manière à autoriser des suivis épidémiologiques plus fins.

II - Généralités

2.1 - La maladie de Chagas

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, 500 000 personnes par an sont nouvellement infectées et 90 millions de personnes sont exposées à la maladie (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, cette maladie touche 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 répandue en Amérique du Sud. D'autres sont sylvestres, mais on a récemment recensé l'apparition de ces espèces en zones domestiques.

2.2 - Le parasite

2.2.1 - 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, contenant un ADN extranucléaire, l'ADN kinétoplastique.

2.2.2 - Morphologie

Durant son cycle évolutif, *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, infectant les cellules réticulo-histiocytaires et musculaires ;
- la forme épimastigote, forme de multiplication, se limitant au tube digestif de l'insecte vecteur.

2.2.3 - Cycle évolutif

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 excoaration ou à travers une muqueuse saine. Elles sont internalisées dans les 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 infectées.

III - Position du problème

D'après les études de génétique des populations, la diversité génétique considérable de *T. cruzi* est de nature clonale : les populations du parasite, du fait d'un mode de propagation essentiellement uniparental, sont composées de clones naturels, stables dans l'espace et dans le temps (2,3,4). Ce modèle n'exclut pas l'existence de phénomènes d'échanges génétiques (sexualité au sens large) occasionnels, qui viendraient moduler le devenir évolutif des clones sur le long terme.

Le terme de clone, qui prête quelquefois à confusion, doit être ici précisé : l'acceptation courante en génétique des populations désigne toute lignée génétiquement identique à l'organisme parental, quel que soit en fait le mode de reproduction particulier de l'espèce étudiée. Il s'agit donc d'une notion très différente de celle que l'on emploie communément pour désigner un clone bactérien par exemple (ensemble de cellules dérivant les unes des autres par mitose simple).

Actuellement, deux questions fondamentales concernant le modèle clonal demandent à être explorées :

1 - **variabilité résiduelle des clones**

Les "clones naturels" mis en évidence par un nombre forcément limité de marqueurs génétiques ne sont pas présentés comme de "vrais" clones, mais plutôt, comme des familles de clones naturels étroitement apparentés (4). En augmentant la résolution du marquage génétique, on risque logiquement de mettre en évidence une variabilité "microclonale" résiduelle au sein de chacun des "clones" (4).

Le terme de "clonet" a été proposé pour désigner, chez une espèce clonale, l'ensemble des

individus (ou souches) qui apparaissent identiques pour une série donnée de marqueurs génétiques (5). Il est donc important d'essayer de cerner la variabilité génétique véritable pouvant exister au sein d'un "clonnet" donné, car les différents génotypes additionnels qui le subdivisent pourraient avoir une importance épidémiologique ou médicale.

2 - clones ou espèces cryptiques?

Les études de génétique des populations portant sur de nombreuses espèces de protozoaires parasites (2,6,7,8) ou sur les bactéries (9,10) concluent à une structure clonale en se basant avant tout sur des arguments indirects : l'observation de déséquilibres de liaison considérables dans les populations naturelles de ces microorganismes. Dans les populations sexuées, les génotypes observés à des loci différents sont "à l'équilibre", c'est-à-dire qu'ils se réassocient entre eux de façon aléatoire. Le déséquilibre de liaison désigne la situation contraire, et est donc pris comme argument indirect pour dire que la population est peu ou pas sexuée.

Cette approche a été récemment revue par Maynard Smith et al. (1993) (11), qui distinguent plusieurs causes possibles de déséquilibre de liaison, en sus du modèle clonal "vrai". En particulier, ces auteurs proposent de conduire l'analyse de déséquilibre de liaison, non pas sur l'espèce dans son ensemble, mais au sein de chacun des phylums génétiques qui la composent. Le modèle sous-jacent est que ces phylums pourraient constituer autant d'espèces sexuées vraies, chacune étant panmictique. Le déséquilibre de liaison viendrait alors, non pas d'une structure clonale, mais d'une association de plusieurs espèces différentes. Dans ce cas, le fait de conduire les analyses de génétique des populations pour chaque phylum (= espèce putative) séparément devrait entraîner une disparition du déséquilibre de liaison, qui devrait au contraire persister si l'organisme était réellement clonal.

Le problème a été posé de façon similaire par Tibayrenc, 1993 (12).

Cependant, ce travail a attiré l'attention sur un problème méthodologique majeur, non relevé par Maynard Smith et al. (1993) : en faisant les tests non sur une espèce globale, mais sur des subdivisions de cette espèce, on diminue en proportion, non seulement le nombre d'individus (ce qui peut être corrigé), mais aussi, et surtout, la variabilité génétique (nombre de loci polymorphes, nombre de génotypes différents aux loci polymorphes). Ce faisant, on diminue la puissance des tests, pour arriver finalement à la situation limite d'une absence de polymorphisme, dans laquelle tout test et donc, toute conclusion sont impossibles.

Le présent travail répond à cette double interrogation : il prend comme modèle d'étude un "clonnet" de *T. cruzi* (numéro 39 d'après Tibayrenc et Ayala, 1988 (3)). Ce clonnet a été défini préalablement sur la base de 15 loci isoenzymatiques. Il semble présenter une grande importance épidémiologique du fait de son caractère ubiquiste : il est très fréquemment échantillonné dans toute l'aire du sud de l'endémie chagassique, au Chili, en Bolivie et au Brésil. Il a reçu pour cela le nom de "clone majeur".

Notre étude a donc consisté à explorer la variabilité résiduelle de ce clonnet grâce à un marquage génétique hautement résolutif, et à tester sur lui l'approche de Maynard Smith (analyse de déséquilibre de liaison conduite sur le seul clonnet 39, et non sur l'espèce *T. cruzi* dans son ensemble).

IV - Matériel et méthodes

4.1 - Matériel biologique

Notre étude a été réalisée sur :

- 50 souches d'un clone 39 de diverses origines géographiques (Annexe 1). Ces souches ont été prélevées soit sur l'homme, soit sur *Triatoma infestans*.
- 7 souches appartenant à des clones de référence plus ou moins apparentés génétiquement : clones n° 12, 17, 27, 30, 32, 33, et 43 (3). La figure A montre un "réseau de Wagner" établissant les relations phylogénétiques de ces différents génotypes clonaux de *T. cruzi* les uns par rapport aux autres (3).
- 1 souche de *T. rangeli* isolée l'homme.
- 1 souche de *T. cruzi marenkellei*, sous-espèce morphologiquement identique à *T. cruzi*, dont les relations phylogénétiques avec *T. cruzi* et le pouvoir pathogène chez l'homme sont mal connus.

4.2 - Extraction de l'ADN

L'ADN est purifié à partir de culots de parasites. L'extraction de l'ADN génomique est réalisée en 3 étapes :

- **lyse des cellules** : le culot parasitaire est lysé à 55°C pendant une nuit dans 400 µl de tampon de lyse (Tris-HCl pH 8 10 mM ; EDTA 1 mM ; SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 1%) en présence de 100 µg/ml de protéinase K.

- **déprotéinisation** : les protéines sont éliminées par deux extractions au phénol, suivies de deux extractions au chloroforme. Après chaque extraction, la solution est bien homogénéisée et centrifugée à 12000 x g pendant 5 min à 20°C. La phase aqueuse contient l'ADN.

- **précipitation de l'ADN** : l'ADN est précipité dans l'éthanol absolu froid pendant une heure à - 70°C. Après centrifugation à 12000 x g pendant 15 min à froid, le culot d'ADN est lavé à l'éthanol froid à 70%, puis séché et resuspendu dans un volume minimum d'eau stérile.

La concentration d'ADN est mesurée par spectrophotométrie. Un spectre d'absorption est ainsi établi à des longueurs d'ondes variant de 210 nm à 300 nm (UV). Une contamination par de l'ARN ou par des protéines se traduit par une distorsion de la courbe. Le pic d'absorption maximum pour un ADN purifié se situe entre 257 nm et 260 nm. La concentration est calculée à partir de la densité optique (DO) au maximum d'absorption : une unité de DO représente une concentration de 50 µg/ml d'ADN double brin. L'ADN en solution est conservé dans de l'eau stérile à - 20°C.

4.3 - Amplification de l'ADN par amorce aléatoire ou RAPD

4.3.1 - Généralités

Les marqueurs génétiques moléculaires se sont révélés être d'excellents outils d'analyse de la

variabilité génétique et des liens de parenté génétique. Le développement depuis trois ans de la technique RAPD montre le potentiel important de cette méthode (8,13).

Le principe de cette technique repose sur l'amplification d'ADN génomique avec une amorce de 10 nucléotides dont la séquence est arbitrairement sélectionnée. Les amorces détectent un polymorphisme en absence de toute information sur une séquence d'acide nucléique spécifique, et le polymorphisme fonctionne comme un marqueur génétique (14,15). L'amorce s'apparie à des séquences complémentaires accessibles sur l'ADN dénaturé et la Taq polymérase permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir de l'extrémité 3' de ces amorces.

Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,6 %. La présence ou l'absence de fragments amplifiés dépend de l'existence, dans le génome étudié, de séquences complémentaires à l'amorce. Le profil d'amplification dépend ainsi de l'amorce utilisée, mais aussi des conditions de réaction (16).

Dans l'état actuel des connaissances, ces bandes ne peuvent être interprétées en terme d'allèles. Un profil définit un génotype non allélique. Presque tous les marqueurs RAPD sont des marqueurs dominants, et il n'est pas possible de distinguer si un segment d'ADN est amplifié à partir d'un locus hétérozygote ou homozygote. Les marqueurs RAPD codominants, observés comme des segments amplifiés d'ADN de différentes tailles à partir d'un même locus, sont détectés très rarement (14). Par conséquent, on part du principe qu'une amorce donnée pour un ADN donné amplifie un locus, ou un groupe de loci et qu'une autre amorce amplifiera un autre locus, ou d'autres loci (17).

Les RAPD sont susceptibles de détecter le polymorphisme engendré par divers événements mutationnels comme : une délétion ou encore une insertion dans la séquence d'appariement de l'amorce, mais aussi une délétion ou une insertion génomique qui induit un changement de taille du segment d'ADN amplifié (14). Dans la plupart des cas, ces remaniements génomiques sont irréversibles de sorte qu'ils constituent d'excellents marqueurs génétiques. Les RAPD ont été utilisés avec succès pour l'identification génétique de souche de protozoaires variés, dont *Trypanosoma* (8,18).

4.3.2 - La technique RAPD

Les conditions techniques que nous avons utilisées, sont analogues à celles de Williams et al. (19).

4.3.2.1 - Réactifs et matériel

Les amorces oligonucléotidiques, constituées de 10 nucléotides ne contiennent aucun palindrome. Les amorces choisies ont été préalablement testées par Tibayrenc et al. (8). Dans notre étude, nous utilisons douze amorces différentes : A1, A2, A3, A5, A8, A9, A11, A12, A13, A17, A19 et A20 (Operon Technologies) (Annexe 2).

Le programme d'amplification comprend :

- 45 cycles comportant trois segments :
 - + dénaturation (1 min à 94°C).
 - + appariement (1 min à 36°C).

- + synthèse (1 min à 72°C).
- 1 cycle d'élongation finale de 7 min à 72°C.

4.3.2.2 - Amplification et visualisation des bandes

- **Amplification** : pour éviter des contaminations par des molécules d'ADN exogènes, les manipulations sont effectuées dans des conditions strictes. La préparation des échantillons est faite dans une pièce, l'amplification, dans une autre. 10 ng d'ADN sont amplifiés dans 100 µl de milieu réactionnel (Tris-HCl 10 mM pH 8,3 ; MgCl₂ (6H₂O) 1,5 mM ; KCl 50 mM ; gélatine 100 µg/ml ; dNTP 100 µM chacun) en présence de l'amorce (Bioprobe) 0,2 mM et de 1,5 U de Taq (Boehringer mannheim).

Un témoin négatif contenant tous les réactifs sauf la matrice ADN, est inclus dans chaque série d'amplification pour vérifier l'absence de bandes de taille similaire aux fragments amplifiés dans les échantillons étudiés.

- **Gels d'électrophorèse** : les fragments d'ADN amplifiés sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur :

+ gel d'agarose : à 1,6% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. La migration est faite à 10 Volts/cm pour les minigels et 5 Volts/cm pour les grands gels. Le gel est ensuite observé sous UV et photographié.

+ gel de polyacrylamide : à 4%. La migration est réalisée à 10 Volts/cm. Les bandes d'amplification sont mises en évidence par coloration au nitrate d'argent (20).

Le marqueur de poids moléculaire utilisé est un ADN de phage λ digéré par l'enzyme BstEII allant de 702 paires de bases (pb) à 8453 pb.

4.4 - Lecture des profils RAPD

Les bandes sont codées en commençant par le chiffre 1 pour la bande présentant la mobilité électrophorétique la plus faible (donc le fragment d'ADN le plus grand). Pour chaque amorce, chaque stock est donc représenté par un ensemble de nombres (Annexe 1).

Chaque stock est caractérisé par un ensemble de profils correspondant aux différentes amorces utilisées. Tous les stocks identiques pour les 12 amorces seront rangés dans un même "RAPDème" (terme utilisé par analogie avec "zymodème" : ensemble des stocks présentant le même profil isoenzymatique). Les degrés de parenté génique entre deux RAPDèmes donnés seront estimés par le pourcentage de bandes communes, observées sur les profils d'électrophorèse.

Bien qu'une amorce donnée soit susceptible d'amplifier plusieurs loci pour un ADN et que les loci amplifiés ne soient pas forcément les mêmes entre deux souches différentes, les génotypes révélés par une amorce sont traités d'un point de vue statistique comme "génotypes multiloci". En effet, pour les tests de déséquilibre de liaison que nous employons, ce traitement statistique est licite (11), car les chances que deux amorces différentes amplifient les mêmes loci sont négligeables (McClelland, communication personnelle).

4.5 - Méthodes d'analyse des résultats

4.5.1 - Evaluation et visualisation des distances génétiques

Deux indices de distance différents ont été utilisés pour évaluer les degrés de dissemblance entre les zymodèmes et les RAPDèmes. La distance de Jaccard ne recense que la présence ou l'absence des bandes, sans tenir compte de leur intensité de révélation (21).

La distance de Jaccard se calcule avec la formule suivante :

$$DJ = 1 - (C/2N - C)$$

dans laquelle :

C : nombre de bandes communes entre les deux génotypes comparés ;

N : nombre total de bandes dans les deux génotypes comparés.

La distance de Jaccard a été utilisée aussi bien pour les données isoenzymatiques que pour les résultats RAPD.

L'autre distance, qui a été utilisée seulement pour les RAPD, prend en compte, non seulement la présence des bandes, mais également leur intensité. Il semble que cette dernière ait une certaine importance phylogénique dans le cas des données moléculaires. Cette distance (22) est basée sur la formule : $D = 1 - S_{AB}$, avec :

$$S_{AB} = \frac{\sum_{i=1}^k (a_i + b_i - |a_i - b_i|)}{\sum_{i=1}^k (a_i + b_i)}$$

dans laquelle a_i et b_i sont les intensités (codées de 1 à 3 en allant de la plus faible vers la plus intense) des bandes i dans les profils A et B, respectivement, et k est le nombre de bandes.

Les deux types de distance ont été calculées par ordinateur. La distance de Jaccard a été évaluée avec le logiciel TAXO de Serres et Roux (23), tandis que la seconde distance a été calculée grâce à un nouveau logiciel élaboré au laboratoire.

Pour les deux types de distance, des dendrogrammes UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages) ont été élaborés (24). Ils constituent un résumé visuel des matrices de distances.

4.5.2 - Analyse de génétique des populations

Les deux conséquences principales de la reproduction sexuée sont la ségrégation des allèles à un locus donné et la recombinaison des génotypes d'un locus à l'autre. L'absence de l'une ou de l'autre apportent donc des arguments indirects en faveur d'obstacles au flux génique (ou écart à la panmixie).

Dans tous les tests que nous utilisons, l'hypothèse nulle est constituée par une situation panmictique, car c'est le seul cas dans lequel les prédictions statistiques théoriques soient clairement codifiées.

Les analyses permettant de rejeter l'hypothèse panmictique sont des tests statistiques étudiant les phénomènes de recombinaison et de ségrégation (7).

La ségrégation est explorée par la statistique classique de Hardy-Weinberg. Soit un gène auquel ségrègent deux allèles, a et b . La fréquence de a est p , et la fréquence de b est $q = 1 - p$. La loi de Hardy-Weinberg prédit que dans une situation panmictique, les fréquences de chacun des 3 génotypes possibles, à savoir a/a , a/b et b/b seront respectivement de p^2 , $2pq$ et q^2 .

Les tests de ségrégation présentent l'inconvénient de nécessiter que :

- le degré de ploïdie de l'organisme étudié soit connu ;
- cet organisme ne soit pas haploïde ;
- il soit possible d'identifier les allèles et les loci.

Les tests de recombinaison, à la différence des tests de ségrégation, permettent de s'affranchir totalement de ces impératifs, ce qui les rend extrêmement "robustes" (7,8,25). Dans une population panmictique, la fréquence théorique d'un génotype multilocus doit être égale au produit des fréquences observées des génotypes uniloci qui la constituent. L'association non aléatoire de deux loci constitue par définition un déséquilibre de liaison. Une série de tests complémentaires qui explorent différentes facettes du déséquilibre de liaison ont été conçus, et informatisés sur Turbo Pascal (7).

- test d1 : il évalue la probabilité (par analyse combinatoire) d'obtenir, par hasard et dans une population panmictique, un génotype multilocus donné avec un effectif égal ou supérieur à celui qui est observé dans l'échantillon observé.

- test d2 : il calcule, en partant des fréquences uniloci observées, la probabilité d'obtenir un génotype multilocus quelconque avec une fréquence égale ou supérieure à celle du génotype multilocus le plus fréquent dans la population étudiée.

- test e : il estime la probabilité d'obtenir un nombre de génotypes multiloci différents égal ou inférieur à ce qui est effectivement observé dans la population.

- test f : il calcule la probabilité d'obtenir un niveau de déséquilibre de liaison supérieur ou égal à celui observé dans la population étudiée.

Les tests d2, e et f sont basés sur des simulations de Monte Carlo (10000 simulations).

Le test g repose sur la corrélation observée entre marqueurs génétiques différents dans une population donnée. Il s'agit d'un cas particulier de déséquilibre de liaison. Cette corrélation se mesure sur les distances génétiques obtenues à partir de deux marqueurs génétiques différents (ici : isoenzymes et RAPD) pour toutes les paires possibles de souches. Elle peut être évaluée par le test de corrélation classique, ou, mieux, par un test de Mantel (26). Cette manière de faire est plus rigoureuse que la corrélation classique, car quand on mesure la corrélation pour toutes les paires de souches possibles entre les distances établies à l'aide de deux marqueurs génétiques indépendants, les différentes cellules des matrices de distances ne sont pas rigoureusement indépendantes les unes des autres.

Pour l'analyse de génétique des populations, dans le cas des RAPD, une interprétation spéciale

doit être conduite (25). En effet, du fait qu'il est impossible à l'heure actuelle de mener des expériences de croisement chez *T. cruzi*, cette technique ne permet pas d'individualiser de loci. Cependant, comme nous l'avons vu, les chances que deux amorces différentes révèlent le polymorphisme d'un même locus sont considérées comme négligeables (McClelland, communication personnelle). La variabilité mise en évidence par des amorces différentes concerne des loci indépendants. Les tests de recombinaison peuvent alors être effectués (mais pas ceux de ségrégation, à cause des conditions d'utilisation très strictes qu'ils exigent). Pour une amorce donnée, chaque profil différent est assimilé à un génotype élémentaire multilocus distinct dont la composition en allèles et en loci demeure hypothétique. Une série d'amorces révélera des génotypes composites dont la fréquence théorique est égale au produit des fréquences observées des génotypes élémentaires qui les composent.

V - Résultats

5.1 - Profils d'amplification

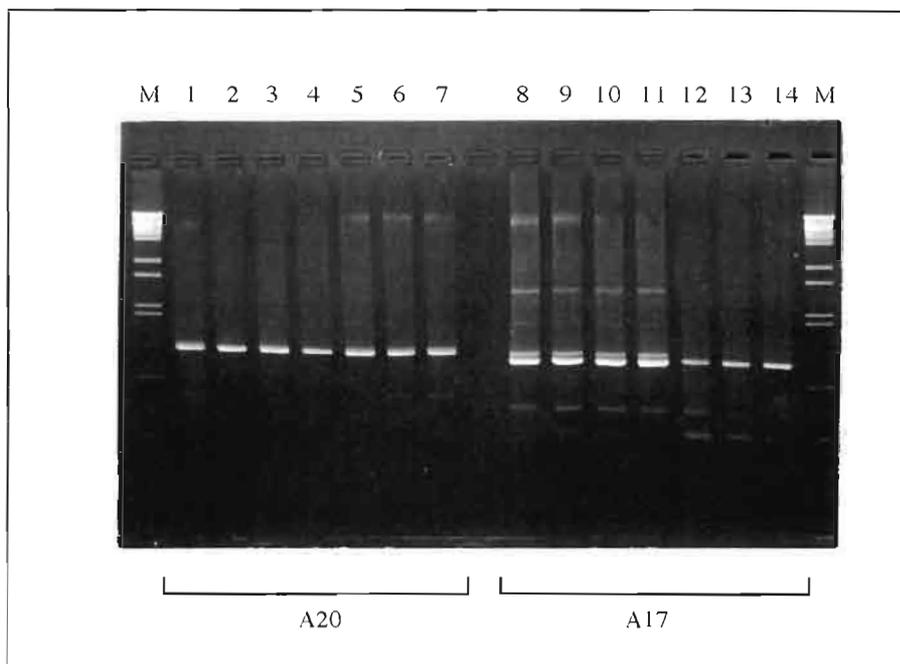
Les résultats portent sur douze séries d'amplification obtenues pour 12 amorces différentes. Les profils obtenus sont reproductibles. Certaines amorces comme l'A20, ne montrent aucune variabilité (Fig. B et annexe 1). D'autres amorces, comme l'A2, l'A8 et l'A19 ne montrent que très peu de variabilité (Annexe 1). En revanche, les profils d'amplification obtenus avec les amorces A9 et A13 sont complexes (Fig. C et annexe 1).

Une étude complémentaire sur gel de polyacrylamide révèle une meilleure séparation des fragments amplifiés. Par exemple, l'amorce A20 (puits 1, 2 et 3) génère sur gel d'agarose une bande majeure monomorphe d'environ 820 pb (Fig. D). En fait, cette même bande correspond sur gel de polyacrylamide à deux fragments de tailles très voisines dont la mauvaise séparation sur gel d'agarose est à l'origine de la forte intensité de la bande monomorphe détectée. Par contre, le doublet de bandes d'environ 750 pb et 702 pb observé avec l'amorce A8 (puits 8) sur gel d'agarose est mieux séparé sur gel de polyacrylamide sans pour autant révéler de fragments supplémentaires. Quant à la souche PO275 (puits 9), le fragment de 700 pb est dédoublé sur gel de polyacrylamide en deux bandes dont la taille ne diffère que d'environ 30 pb. Ce dernier cas montre que la résolution de la séparation sur gel de polyacrylamide permet de révéler une plus grande variabilité que sur gel d'agarose.

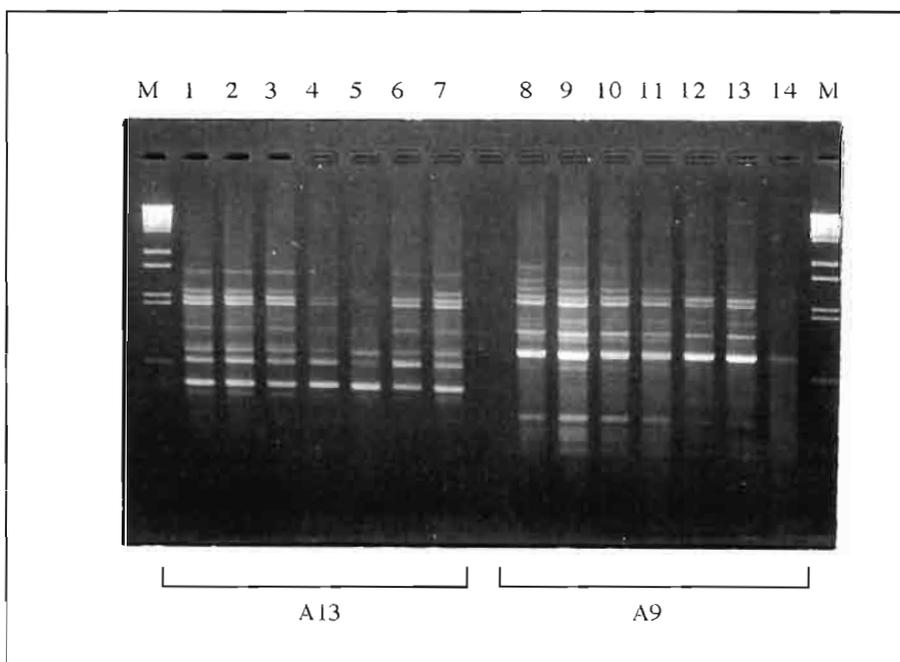
Il apparaît donc que l'analyse des profils RAPD en gel de polyacrylamide apporte une information complémentaire utile, puisqu'elle permet :

- d'affiner l'interprétation de certaines bandes majeures et d'augmenter par là la variabilité.
- de prévoir, dans le cadre d'isolement d'une sonde nucléotidique spécifique à partir de fragments RAPD, l'existence d'un groupe hétérogène de bandes de taille très proche. Cette information peut être mise à profit au moment du clonage et du criblage par enzymes de restriction des différents produits RAPD.

Cependant, l'analyse en gels de polyacrylamide est plus lourde, et dans l'état actuel de nos techniques, nous la réservons seulement pour des études complémentaires. La technique de typage de routine reste l'électrophorèse sur gels d'agarose. Toutes les analyses de phylogénétique et de génétique des populations pratiquées dans le cadre du présent travail ont été basées sur les résultats issus de cette technique.



Profils d'amplification sur gel d'agarose à 1,6%.
(M = marqueur de poids moléculaire, 1 = CLA, 2 = CCM, 3 = ACG, 4 = 86.1,
5 = Kundera, 6 = JGG, 7 = PSC-O, 8 = CCM, 9 = PO263, 10 = V1672, 11 = LMH,
12 = PSC-O, 13 = PO274 et 14 = GM-O).



Profils d'amplification sur gel d'agarose à 1,6%.
(M = marqueur de poids moléculaire, 1 = VGM, 2 = Kundera, 3 = V2X, 4 = RMS,
5 = NRcl3, 6 = PO275, 7 = PCC, 8 = PMC, 9 = Pucini, 10 = V1672, 11 = Bug1660,
12 = LMH, 13 = GTP91 et 14 = Vin89).

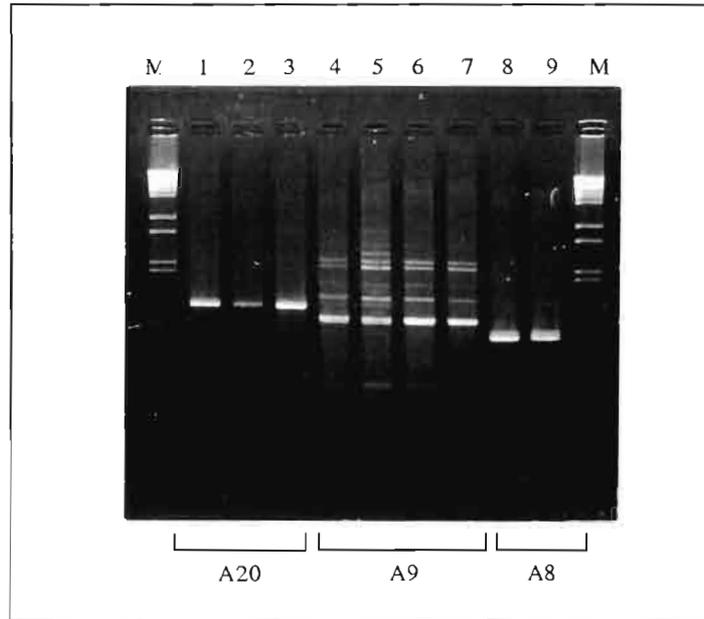


Figure D : Profils d'amplification sur gel d'agarose à 1,6%.
 (M = marqueur de poids moléculaire, 1 = EPP, 2 = DBC-O, 3 = Vin89, 4 = NRcl3, 5 = RC, 6 = JSR3, 7 = Bug2149, 8 = VGM, 9 = PO275).

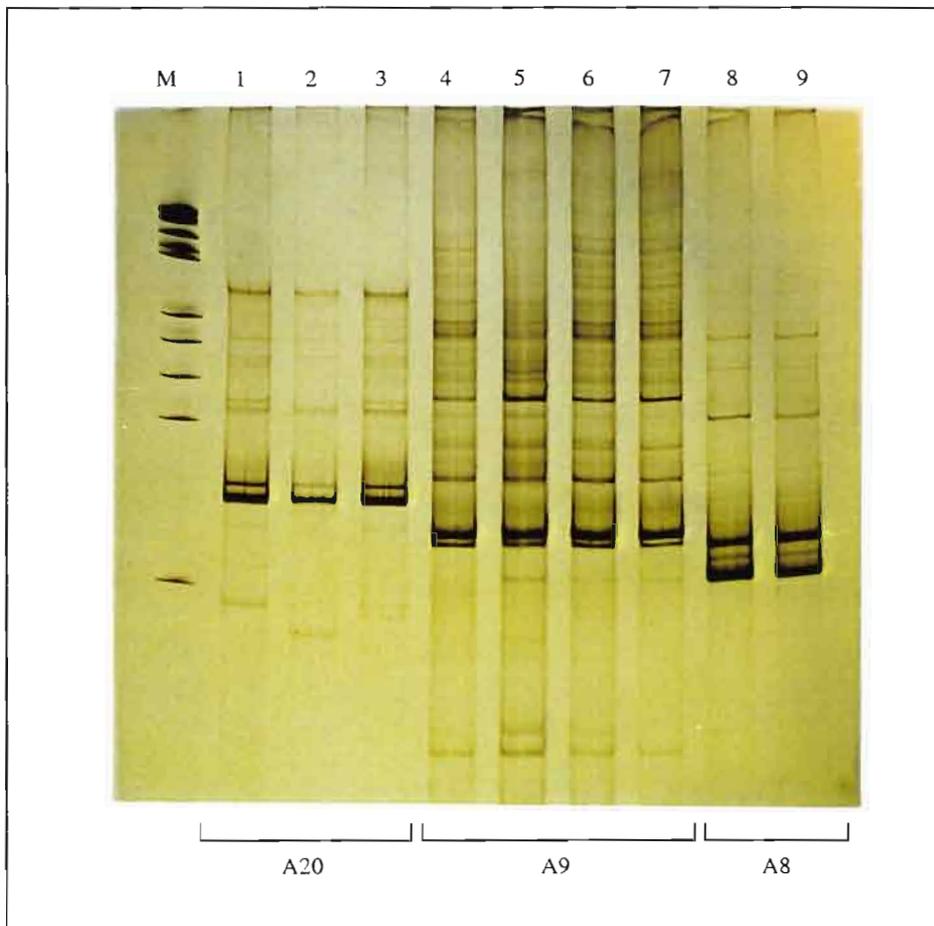


Figure E : Profils d'amplification sur gel de polyacrylamide à 4%.
 (M = marqueur de poids moléculaire, 1 = EPP, 2 = DBC-O, 3 = Vin89, 4 = NRcl3, 5 = RC, 6 = JSR3, 7 = Bug2149, 8 = VGM, 9 = PO275).

L'analyse des profils d'amplification révèle un polymorphisme génotypique important chez le clonot 39 : 50 RAPDèmes différents ont été ainsi définis, soit une variabilité génotypique (nombre de génotypes différents / nombre de souches) égale à 1. Une estimation simple de la variabilité génétique peut être donnée par le taux de polymorphisme (P) qui est le rapport du nombre de loci variables sur le nombre total de loci étudiés. Dans notre étude, $P = 11 / 12 = 0,92$. Remarquons toutefois que les profils RAPD obtenus pour une amorce donnée révèlent très probablement l'activité de groupes de loci, et non celle de loci individuels.

5.2 - Dendrogrammes

Sur le dendrogramme tiré des distances de Jaccard RAPD, toutes les souches définies préalablement comme appartenant au clonot 39 (sur la base du génotype isoenzymatique hétérozygote pour le locus *GPI*) se regroupent au sein d'un ensemble peu hétérogène (Fig. F).

Les autres génotypes de *T. cruzi* s'embranchent de manière très cohérente avec les données antérieures (4,8) (Fig. A et F).

Le dendrogramme tiré des distances RAPD qui prennent en compte l'intensité des bandes est très similaire, quoique le groupe du clonot 39 apparaisse comme plus homogène (Fig. G).

Sur les deux dendrogrammes, *T. cruzi marenkellei* et *T. rangeli* s'embranchent de manière cohérente par rapport à la position phylogénique supposée de ces deux taxons : *T. rangeli* apparaît comme le plus éloigné des souches *T. cruzi*.

5.3 - Tests de génétique des populations

Nous avons effectué une première analyse des résultats obtenus avec 9 amorces, puis avec 12 amorces, les trois dernières amorces ayant été ajoutées à la fin de notre travail de recherche pour affiner l'analyse phylogénique. Nous avons trouvé informatif de mentionner cette étape intermédiaire, car cela nous montre que plus nous augmentons le nombre d'amorces, plus certains tests vont devenir non significatifs.

Parmi les différents tests (voir matériel et méthodes), d1, d2 et e ne sont pas applicables dans le cas où chaque souche a un génotype particulier, puisque ces trois tests sont basés sur la recherche de génotypes répétés. Ils n'ont donc pas été pratiqués avec les données issues de l'étude de 12 amorces.

- **test d1** : il s'est révélé nettement positif pour les 3 génotypes répétés deux fois (avec 9 amorces). Les niveaux de signification sont respectivement de $3,57 \times 10^{-3}$, $9,24 \times 10^{-3}$ et $1,34 \times 10^{-3}$.

- **test d2** : il n'est pas significatif avec 9 amorces, car la probabilité qu'un génotype quelconque soit trouvé 2 fois ou plus est de 0,5706.

- **test e** : il est significatif avec 9 amorces, car nous avons trois répétitions de 2 génotypes et la probabilité d'avoir 47 génotypes différents ou moins est de 0,0448.

- **test f** : il est significatif avec 9 amorces ($P = 0,0008$), c'est-à-dire que nous observons un déséquilibre de liaison, alors qu'il n'est plus significatif avec 12 amorces ($P = 0,0472$; la limite de signification de ce test a été fixée à 0,02 par Tibayrenc et al., 1991) (25).

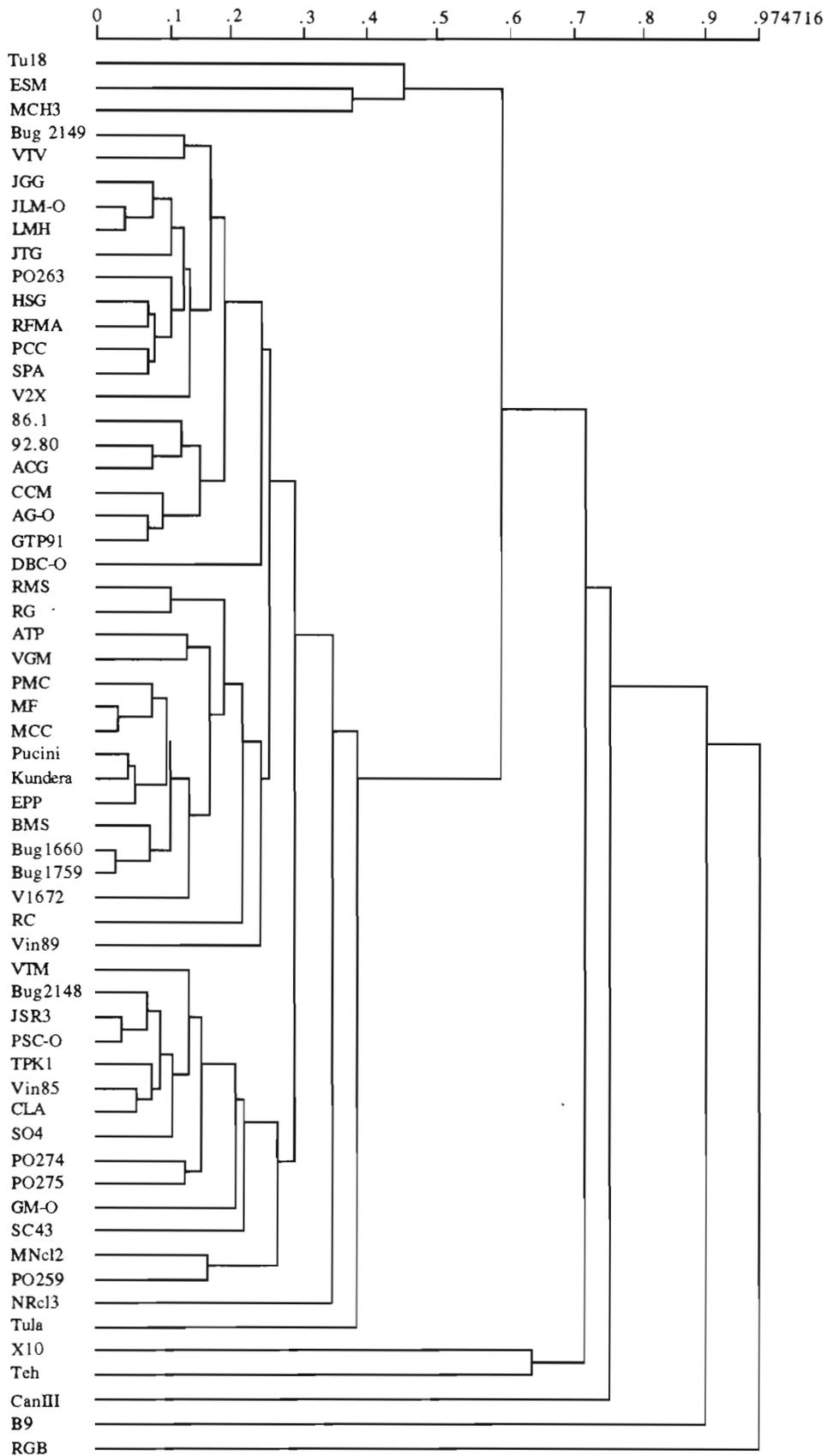


Fig. F : dendrogramme tracé selon la méthode ascendante hiérarchique utilisant la matrice des distances de jaccard estimée à partir des données RAPD.

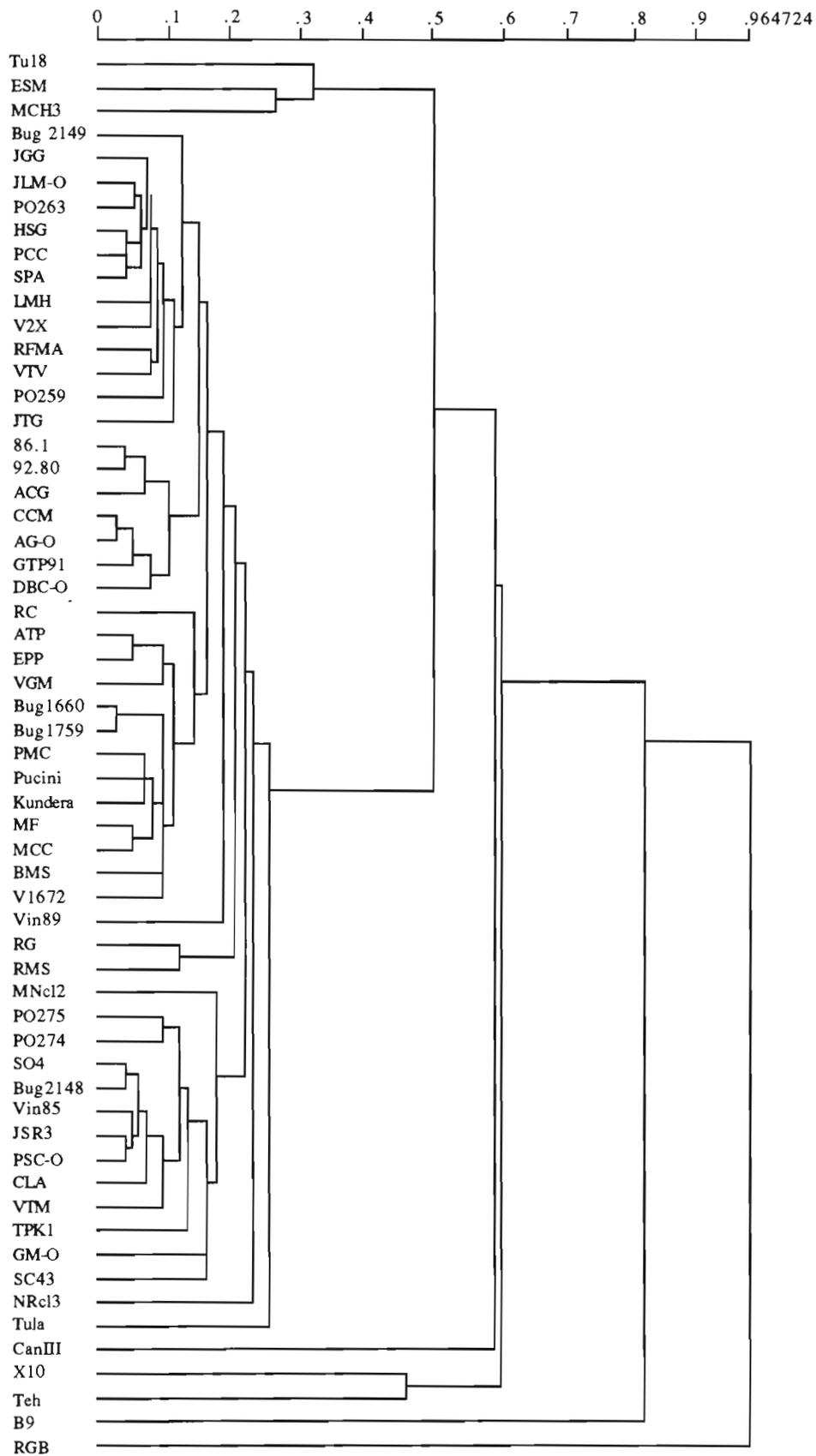


Fig. G : dendrogramme tracé selon la méthode ascendante hiérarchique utilisant la matrice des distances de Jaccard estimée à partir des données RAPD prenant les intensités des bandes électrophorétiques.

5.4 - Apport des résultats isoenzymatiques

Le présent échantillonnage a également été étudié au laboratoire par la méthode d'électrophorèse des isoenzymes sur acétate de cellulose (22 loci), bien que les expérimentations n'aient pas été conduites dans le cadre du présent travail. La comparaison des données isoenzymatiques et RAPD apporte une information précieuse pour estimer la valeur de ce dernier marqueur. Les deux espèces prises comme comparaison (*T. cruzi marenkellei* et *T. rangeli*) n'ont pas été incluses dans cette analyse.

L'analyse des résultats montre une variabilité génotypique au sein du clonot 39 plus faible que celle qui est mise en évidence par les RAPD (15 génotypes différents pour 50 souches : variabilité génotypique = 0,30, alors que cette valeur est de 1,00 pour les RAPD).

- **analyse phylogénique** : le dendrogramme confirme celui obtenu par la méthode RAPD en ce qui concerne les grands points de la classification de *T. cruzi* (Fig. H). Cette bonne concordance entre les deux séries de marqueurs corrobore les résultats obtenus précédemment sur un échantillonnage de souches plus limité (8). Cette concordance est soulignée par le fait que la corrélation entre données isoenzymatiques et RAPD est très fortement significative pour les souches de *T. cruzi* dans leur ensemble (niveau de signification = 0,879).

- **tests de génétique des populations** : la possibilité d'identifier avec les isoenzymes des loci individuels, et d'interpréter leur variabilité en termes d'allèles ouvre la possibilité de pratiquer des tests de ségrégation. Cette analyse a été conduite dans le présent travail uniquement sur le locus *GPI*, qui présente un cas remarquable d'hétérozygotie fixée au sein du clonot 39. Bien que cela ne soit guère nécessaire, un test de Hardy-Weinberg a été pratiqué. Le nombre attendu d'hétérozygotes est de 25, alors que le nombre observé est de 50. Les nombres attendus et observés d'homozygotes sont respectivement de 25 et de 0. Le X^2 est de 50 (degré de liberté = 1, $p \ll 10^{-3}$). Ce résultat doit cependant être interprété avec prudence (cf. discussion).

Les tests de recombinaison (déséquilibre de liaison) d1, d2, f et g (cf. matériel et méthodes) sont tous négatifs avec les données isoenzymatiques au sein du clonot 39.

VI - Discussion

- **valeur du marquage RAPD comme outil épidémiologique et phylogénique** :

Elle est pleinement confirmée par la présente étude : la classification produite à partir des résultats RAPD conforte les connaissances antérieures sur la diversité phylogénique intraspécifique du taxon *Trypanosoma cruzi* (3,4). La remarquable concordance entre les arbres RAPD et isoenzymatiques (soulignée par la corrélation hautement significative entre les deux séries de données) confirme pleinement les résultats obtenus antérieurement sur un échantillonnage de souches plus limité (8).

En tant qu'outil épidémiologique, les RAPD apparaissent prometteurs pour deux raisons :

- ils ont une forte résolution. Dans le présent travail, le clonot 39, qui apparaissait, d'un point de vue technique, comme une entité génétique homogène il y a quelques années (3), éclate en un grand nombre de génotypes dont chacun peut potentiellement être utilisé comme marqueur épidémiologique.

- la valeur de certains fragments comme marqueurs spécifiques d'espèces ou de groupes de souches (8) est pleinement confirmée : il y a là une source potentiellement illimitée de marqueur

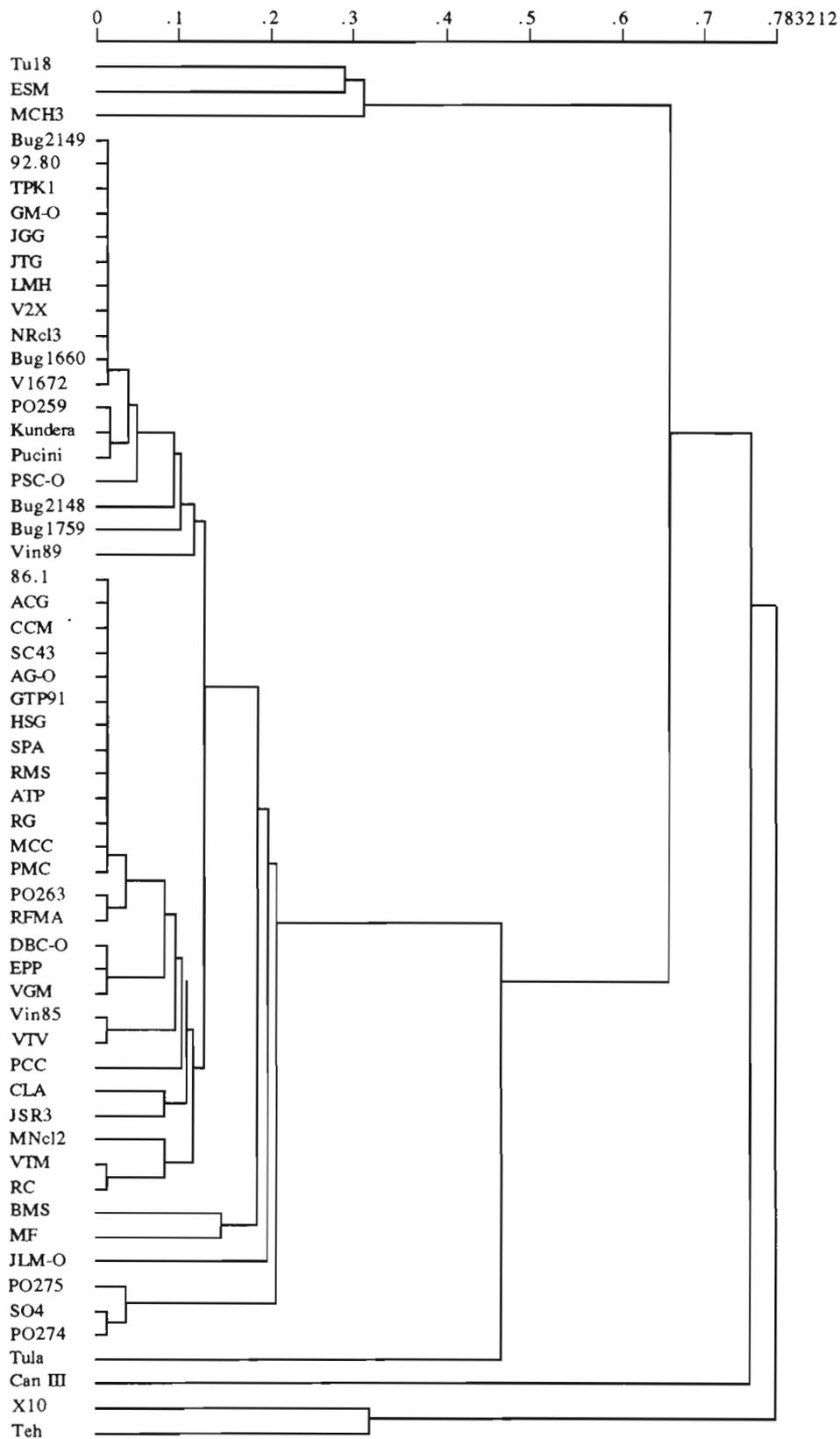


Fig. H : dendrogramme tracé selon la méthode ascendante hiérarchique utilisant la matrice des distances de Jaccard estimée à partir des données isoenzymatiques.

épidémiologiques pouvant être sélectionnées “à la carte” en fonction du degré de divergence phylogénique (espèce, groupe de souches, génotype individuel) que l’on désire identifier. La faible taille des fragments (quelques centaines de paires de bases) rend leur clonage éventuel potentiellement aisé. De telles expérimentations sont en cours dans le laboratoire, le présent DEA ayant contribué à apporter l’information d’amont indispensable. Ces fragments clonés pourront être utilisés comme sonde spécifique. Ils pourront par ailleurs être séquencés, et à partir de leur séquence, il sera possible de sélectionner des amorces autorisant un diagnostic PCR (au niveau de l’espèce, ou à des niveaux phylogéniques inférieurs) sans avoir à cultiver la souche étudiée.

- microévolution et génétique des populations :

Le génotype 39 identifié par des études antérieures (3,4) sur la base de 15 loci isoenzymatiques était défini comme un “clonnet”, c’est-à-dire un génotype clonal défini par l’emploi d’une série donnée de marqueurs génétiques. L’hétérogénéité génétique probable de ce clonnet avait été clairement annoncée (8), et pleinement confirmée par le présent travail, par les données isoenzymatiques, et plus encore, par les résultats RAPD. De façon similaire, une variabilité génétique additionnelle importante a été montrée dans notre laboratoire, par les mêmes techniques que celles qui ont été utilisées ici, au sein du zymodème *Leishmania infantum* MON1. Le parallélisme peut sans doute être poussé très loin entre le génotype 39 de *T. cruzi* et le génotype MON1 de *L. infantum*. Il est permis de supposer que d’un point de vue évolutif, ces deux entités sont très comparables.

Il est difficile avec les présents résultats de savoir si l’ancien génotype 39 est composé d’une série de clones étroitement apparentés, ou s’il correspond à une espèce sexuée cryptique (11,12). Comme cela a été précédemment remarqué (12), en abaissant le niveau d’analyse au niveau de subdivisions phylogéniques toujours plus limitées d’un taxon donné, on diminue proportionnellement le degré de diversité génétique, et par là, le niveau de résolution des tests statistiques. Plus on tend vers le monomorphisme, plus on se rapproche d’une situation où tout test, et donc, toutes conclusions, deviennent impossibles. Dans le cas présent, bien qu’une analyse isoenzymatique plus performante et l’emploi d’un nouveau marqueur (RAPD) aient permis de mettre en évidence une variabilité génotypique substantielle au sein du génotype 39, la diversité génétique globale reste très limitée : les distances génétiques entre les nouveaux génotypes mis en évidence sont faibles.

Quelques tests sont positifs : le d1, le e et le f conduits sur 9 amorces RAPD, le test de Hardy-Weinberg effectué sur le locus isoenzymatique *GPI*. Ils ne permettent cependant aucune conclusion ferme, car leur application ici n’est pas parfaitement rigoureuse : les souches n’ont pas été récoltées en sympatrie, et il se peut que le déséquilibre de liaison (test d1, e et f) soit imputable à leur séparation géographique (dérive génique aboutissant à des différences de fréquences alléliques entre localités). On remarque cependant que deux des génotypes répétés deux fois ((test d1) ; (JLM-O et PO263, d’une part et Vincho85 et CLA, d’autre part)) ont été échantillonnés sur de grandes distances, respectivement : Chili et Bolivie, et deux régions différentes du Chili. Il a été montré (25) que quand le déséquilibre de liaison est imputable à la dérive génique et à la distance géographique, les génotypes surreprésentés (test d1) tendent à être localisés dans des parties restreintes de la zone d’étude.

En ce sens, les résultats du test de Hardy-Weinberg seraient encore plus probants, puisqu’ils montrent un excès considérable d’hétérozygotes (alors que l’effet Wahlund, résultat de la séparation géographique, aboutit à l’effet inverse). Cependant, nous avons vu que les tests de ségrégation reposent sur l’hypothèse de travail non pleinement vérifiée que *T. cruzi* est diploïde. Ce résultat,

quoiqu'informatif, n'est donc pas parfaitement probant.

Nous retiendrons des tests de génétique des populations :

- qu'ils montrent certains indices significatifs d'écart à la panmixie en dépit de la faible variabilité génétique observée ;
- qu'ils demandent absolument à être complétés par une étude plus approfondie.

VII - Conclusion

Le présent travail, basé sur un nombre relativement limité de souches, et focalisé sur le cas particulier du clonot 39, doit être considéré comme préliminaire. Cependant, il fournit les bases nécessaires aux développements que permettront des programmes ultérieurs du laboratoire d'accueil, dont notre projet de thèse.

La valeur épidémiologique et phylogénique des marqueurs RAPD est pleinement confirmée, et sera explorée en profondeur par les approches brièvement décrites dans la discussion (utilisation d'un nombre d'amorces beaucoup plus important, clonage et séquençage des fragments les plus intéressants).

La question de génétique des populations posée (clonot 39 : ensemble de clones ou espèce cryptique?) n'a pu être tranchée dans le cadre de la présente étude, comme on pouvait le craindre (12).

La seule manière de reprendre le problème est de faire un sondage plus fort :

- au niveau des populations en prenant un nombre plus important de souches. Il serait préférable d'effectuer un échantillonnage en sympatrie en prélevant un certain nombre de souches en un endroit donné, mais également un échantillonnage allopatrique en prélevant des souches en des endroits géographiquement éloignés, comme la Bolivie qui est le pays où on a trouvé initialement le clonot 39, le Chili et le Brésil par exemple. Le premier échantillonnage permettra de pratiquer les tests dans des conditions parfaitement rigoureuses, tandis que le deuxième permettra d'évaluer le caractère plus ou moins ubiquiste des différents géotypes.
- mais encore plus au niveau du marquage génétique, en testant davantage d'amorces RAPD et en essayant surtout un marqueur à horloge moléculaire plus rapide, comme le "fingerprinting" par microsatellites (27). Ceci permettra, toutes choses égales par ailleurs, de mettre en évidence davantage de diversité génétique au sein du clonot 39.

Il faut souligner que la distinction entre les deux modèles (clonal "vrai" ou spéciation cryptique, les clonets correspondant en fait à des espèces sexuées peu polymorphes) est plus importante pour la recherche fondamentale que pour l'épidémiologie et la médecine. En effet, pour la recherche appliquée, certaines des implications des deux hypothèses sont très similaires : selon les deux modèles, le taxon *T. cruzi* est subdivisé en lignée phylogénétiques très divergentes, chacune étant peu polymorphe. Or, il a été montré dans le laboratoire d'accueil que la divergence phylogénique entre géotypes de *T. cruzi* avait un fort impact sur leurs propriétés biologiques (comportement en culture, virulence chez la souris, sensibilité aux médicaments in vitro). Cette conclusion reste valide, que *T. cruzi* soit subdivisé en "vrais" clonets ou en espèces cryptiques.

Pour l'emploi des marqueurs génétiques en épidémiologie, par contre, les deux hypothèses n'ont pas des implications parfaitement identiques : si le génotype 39 est un "vrai" clonet (c'est-à-dire un ensemble de clones naturels étroitement apparentés), chacun des "miniclones" qui le compose peut être utilisé comme marqueur épidémiologique indépendant, stable dans l'espace et dans le temps. Au contraire, si le "clonet" 39 correspond à une espèce sexuée cryptique, les génotypes qui le subdivisent ne sont que des variants individuels instables, inappropriés pour le marquage épidémiologique. L'unité de marquage ici est le génotype 39 dans son ensemble, et les seuls marqueurs épidémiologiques utilisables sont les caractères génétiques monomorphes au sein de cette espèce sexuée (par exemple : le génotype hétérozygote du locus isoenzymatique *GPI*).

Pour les études ultérieures, comme dans le cadre du présent travail, l'hypothèse nulle sera celle de la spéciation cryptique (avec panmixie au sein du clonet 39), tandis que l'hypothèse de travail sera celle de la clonalité au sein du clonet 39.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Anonyme. 1991.
Lutte contre la maladie de Chagas.
Rapport d'un comité O.M.S. d'experts, **811**.

- 2 - Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M. et Carlier, Y. 1981.
Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi*, implications taxonomiques.
Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, **293** : 207-209.

- 3 - Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. and Ayala, F.J. 1986.
Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **83** : 115-119.

- 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 - Tibayrenc, M., Kjellberg, F. and Ayala, F.J. 1991.
The clonal theory of parasitic protozoa : a taxonomic proposal applicable to other clonal organisms.
BioScience, **41** : 767-774.

- 6 - Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M., Dedet, J.P., Poch, O. and Desjeux, P. 1985.
New electrophoretic evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of chagas' disease.
Genetica, **67** : 223-230.

- 7 - Tibayrenc, M., Kjellberg, F. and Ayala, F.J. 1990.
A clonal theory of parasitic Protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (Evolution), **87** : 2414-2418.

- 8 - Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D. and Ayala, F.J.
Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, (1993), **90** : 1335-1339.

- 9 - Selander, R.K. and Levin, B.R. 1980.
Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations.
Sciences, **210** : 245-247.

- 10 - Selander, R.K., Musser, J.M., Caugant, D.A., Gilmour, M.N. and Whittam, T.S. 1986.
Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.
Applied Environmental Microbiology, **51** : 873-884.
- 11 - Maynard Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M. and Spratt, B.G. 1993.
How clonal are bacteria ?
Proceedings of the National Academy of sciences of the USA, **90** : 4384-4388.
- 12 - Tibayrenc, M. 1993.
Entamoeba, Giardia and Toxoplasma : clones or cryptic species ?
Parasitology Today, **9**, (3) : 102-105.
- 13 - Hadrys, H., Balick, M. et Schierwater, B. 1992.
Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology.
Molecular Ecology, **1** : 55-63.
- 14 - Williams, J.G.K., Kubelick, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, U.S. 1990.
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Research, **18**, (22) : 6531-6535.
- 15 - Welsh, J. and McClelland, M. 1990.
Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.
Nucleic Acids Research, **18** : 7213-7218.
- 16 - MacPherson, J.M., Eckstein, P.E., Scoles, G.J. and Gajadhar, A.A. 1993. .
Variability of the random amplified polymorphic DNA assay among thermal cyclers, and effects of primer and DNA concentration.
Molecular and Cellular Probes, **7** : 293-299.
- 17 - Bañuls, A.L. 1993.
Analyse génétique d'isolats naturels sud-américains de Leishmania montrant de possibles phénomènes de recombinaison.
Diplôme d'Etudes Approfondues de Parasitologie, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. pp 30.
- 18 - Steindel, M., Dias Neto, E., de Menezes, C.L.P., Romanha, A.J. and Simpson, A.J.G. 1993.
Random amplified polymorphic DNA analysis of Trypanosoma cruzi strains.
Molecular Biochemical Parasitology, **60** : 71-80.
- 19 - Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, U.S. 1991.
Genetic analysis using RAPD markers.
Methods in Enzymology .

- 20 - Dinesh, K.R., Lim, T.M., Chua, K.L., Chan, W.K. and Phang, V.P.E. 1993.
RAPD analysis : an efficient method of DNA fingerprinting in fishes.
Zoological Science, **10** : 849-854.
- 21 - Jaccard, P. 1908.
Nouvelles recherches sur la distribution florale.
Bulletin de la Société vaudoise de Sciences Naturelles, **44** : 223-270.
- 22 - Schmid, J., Voss, E. and Soll, D.R. 1990.
Computer-assisted methods for assessing strain relatedness in *Candida albicans* by
fingerprinting with the moderately repetitive sequence Ca3.
Journal of Clinical Microbiology, **28** : 1236-1243.
- 23 - Serres, E. et Roux, M. 1986.
Pratique de la classification automatique. L'exemple des *Leishmania*. Taxonomie et
phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques (colloques int. CNRS/INSERM, 1984).
Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques, Montpellier, 27-40.
- 24 - Sokal, R.R. and Sneath, P.H.A. 1963.
Principles of numerical taxonomy.
Freeman, San Francisco, CA.
- 25 - Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brénière, S.F., Dardé, M.L. and Ayala, F.J. 1991.
Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual ? A population genetics advantage.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **88** : 5129-5133.
- 26 - Mantel, N. 1967.
The detection of disease clustering and a generalised regression approach.
Cancer Research, **27** : 209-220.
- 27 - Macedo, A.M., Martins, M.S., Chiari, E. and Pena, S.D.J. 1992.
DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*. A new tool for characterization of strains and
clones.
Molecular Biochemical Parasitology, **55** : 147-154.

ANNEXES

Souches	Clonot	Origines	A1	A2	A3	A5	A8	A9	A11	A12	A13	A17	A19	A20
86.1	39	Bolivia	3-9-11	7	8-10-13-16-17	5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-18-19	6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
9280 cl1	39	Bolivia (Ho)	11	7	8-10-13-16-17	5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-14-17-18-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
AGG	39	Chili (Ho)	11	4-7	8-10-13-16-17	5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-14-17-18-19	6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14	2-4	2
AGO	39	Chili (Ho)	3-11	7	8-10-13-16-17	5-12-13-14	4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
ATP	39	Chili (Ho)	9-11	4-7	8-10-17	2-5-12-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-19	1-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
BMS	39	Chili	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-14	3-4	5-6-8-11-13-14-16-17-20	2-8-10-14-19	1-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
Bug 1660	39	Chili (T.I.)	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-10-19	1-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
Bug 1759	39	Chili (T.I.)	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-10-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
Bug 2148	39	Bresil (T.I.)	9-11	7	8-10-13-16-17	14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-14-19	2-6-8-10	4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
Bug 2149	39	Bresil (T.I.)	3-9-11	4-7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	4-6-8-13-16-17	2-8-18-19	1-2-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
CCM	39	Chili (Ho)	11	4-7	8-10-13-16-17	5-12-13-14	4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-19	2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
CLA	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-19	6-8-10	4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
DBC-O	39	Chili (Ho)	11	7	8-10-17	12-14	4	6-8-11-13-16-17	2-19	2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
EPP	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-10-19	1-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
GM-O	39	Chili (Ho)	11	7	8-10-13-16-17	12-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-19	2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	12	3	2
GTP 91	39	Chili (Ho)	11	4-7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
HSJ	39	Chili (Ho)	9-11	4-7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-19	1-2-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
JGG	39	Chili (Ho)	11	4-7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-19	1-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4-11	2
JLM-O	39	Chili (Ho)	11	4-7	8-10-13-16-17	2-5-12-14	3-4	6-8-11-13-16-17	1-2-8-10-19	1-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
JSR 3	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
JTG	39	Chili (Ho)	11	4-7	8-10-13-16-17	2-12-14	3-4	6-8-13-16-17	2-8-10-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
Kuadon	39	?	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-10-14-19	1-2-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
LMH	39	Chili (Ho)	11	4-7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	1-2-8-10-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
MCC	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-17	2-5-12-13-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-10-14-19	6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
MP	39	Chili	9-11	7	8-10-17	2-5-12-13-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-10-14-19	1-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
MN cl2	39	Chili (Ho)	3-9-11	7	8-10-17	2-5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-14-16-17	2-8-19	1-2-4-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	12	2-4	2
NR cl3	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-17	12-14	4	6-8-13-14-16-17	2-8-10-14-19	6-8-10	16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
PCC	39	Chili (Ho)	3-9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	4	6-8-11-13-16-17	1-2-8-10-19	1-2-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
PMC	39	Chili (Ho)	3-9-11	7	8-10-17	2-5-12-13-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	1-2-8-10-14-19	1-2-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
PO 259	39	Bolivia (Ho)	11	7	8-10-16-17	2-5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	11-12	2-4	2
PO 263	39	Bolivia (Ho)	11	7	8-10-13-16-17	2-12-14	3-4	6-8-11-13-16-17	1-2-8-10-19	1-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
PO 274	39	Bolivia (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-19	2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
PO 275	39	Bolivia (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	8-14-19	6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
PSC-O	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-14-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
Pucini	39	?	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-10-14-19	1-2-6-8-10	4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
RC	39	Chili (Ho)	3-9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-8-10	1-2-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	12	2-4	2
RFMA	39	Chili (Ho)	3-9-11	4-7	8-10-13-16-17	2-5-12-14	3-4	6-8-11-13-16-17	1-2-8-10-19	1-2-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
RO	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	4	5-6-8-11-13-14-16-17-20	2-8-14-16-19	6-8-10	4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
RMS	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-14-17-19	6-8-10	4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
SC 43	39	Bolivia (T.I.)	9-11	4-7	8-10-17	12-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-14-19	6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	11-12	2-4	2
SO4	39	Bolivia (T.I.)	9-11	7	8-10-13-16-17	14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-19	2-6-8-10	2-4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
SPA	39	Chili (Ho)	9-11	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	1-2-8-10-19	1-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
TPK1	39	Bolivia (T.I.)	9-11	7	8-10-13-16-17	12-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-14-19	6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
V1672	39	Chili (T.I.)	3-9-11-12	7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	2-4-5-6-8-13-14-16-17-20	1-2-8-10-14-19	1-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
VZX	39	Chili (T.I.)	11	4-7	8-10-17	2-5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-10-19	1-2-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4-11	2
VGM	39	Chili (T.I.)	3-9-11	7	8-10-13-16-17	2-12-14	3-4	2-4-5-6-8-11-12-13-14-16-17-20	2-16-19	1-6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14-16	2-4	2
Viacho 85	39	Chili (T.I.)	9-11	7	8-10-13-16-17	14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-14-19	6-8-10	2-3-4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
Viacho 89	39	Chili (T.I.)	9-11	7	8-10-13-16-17	12-14	3-4	5-6-8-11-12-13-14-16-17	2-11-14-16-19	1-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12-14	2-4	2
VTM	39	Chili (T.I.)	9-11	7	8-10-13-16-17	14	3-4	4-6-8-11-13-16-17	1-2-8-10-14-19	1-2-4-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	12-16	2-4	2
VTV	39	Chili (T.I.)	3-9-11	4-7	8-10-13-16-17	2-5-12-13-14	3-4	6-8-11-13-16-17	2-8-19	1-2-6-8-10	3-4-6-10-16-18-21	3-6-11-12	2-4	2
Teh cl2	12	?	1-4-8-11-13	3-7	4-8-11-13-16-17	1-3-6-8-13	4	1-16-17	3-8-19	5-6	3-4-6-7-14-16	3-8-9	2	
X 10 cl1	17	?	9-13-18	16-17-18	3-8-11-13-16-17	99	4	1-3-6-8-11-16-17	1-4-5-7-17-18-19	5-6-8-10	99	3-14	3-8-9	2-6
can III Z3	27	?	3-6-7-11	5-7-15	10-12-15-17	2-3-5-7-10-13	3-4	16-17	7-8-9-13-17-18	6-8-10	5-13-21-23	1-3-5-6-9-10-11-13-15-16	10	1-2-5
ESM Z2	30	?	3-10	7-12	2-8-10-13-16-17	4-5-13-14	3-4	4-6-8-11-13-15-17-20	2-5-7-19	4-6	2-4-6-14-21	3-12-14	2-4-6-11	2
Tu 18 cl92	32	?	3-10	4-7-10-12	8-10-13-16-17	5-14	3-4	4-6-8-13-15-16-18-20	2-5-18-19	4-6-9	15-17-21-22	3-12-14	3	2
MCH3	33	?	3-10	7-10-12-13	2-8-10-12-16-17	4-5-14	3-4	6-8-11-13-15-20	1-2-5-10-19	6	2-3-4-9-15-17-21	3-12-14	2-4	2
Tuis cl2	43	?	9-11	4-7	8-10-13-16-17	2-3-4-5-9-13	3-4	2-4-6-8-13-16-17	1-2-5-18-19	1-6-8-10	1-2-3-4-6-10-14-16-18-21	3-6-11-12-14-16	4	2
B9	T. cruzi marenkellei	?	2-5-7-9-11-15	7-8-11-18	3-7-14-17-18-19	11	4	7-9-16-18-19-21	14	2-7-12	12-20	2-8	1-3-7	2
RGB	T. rangeli	?	10-12-14-16-17-19	1-2-4-6-9-14	1-6-7-9	7	1-2-5-6	10-18-19	6-12-15-16	3-11	7-8-11-19	6-12-17	12	3-4

Annexe 1 :

Génotypes observés en RAPD des souches étudiées de *T. cruzi*, *T. cruzi marenkellei* et *T. rangeli*.

Amorces	Séquences
A1	CAGGCCCTTC
A2	TGCCGAGCTG
A3	AGTCAGCCAC
A5	AGGGGTCTTG
A8	GTGACGTAGG
A9	GGGTAACGCC
A11	CAATCGCCGT
A12	TCGGCGATAG
A13	CAGCACCCAC
A17	GACCGCTTGT
A19	CAAACGTCGG
A20	GTTGCGATCC

Annexe 2 :

Séquences des 12 amorces utilisées dans notre étude.

**PROJET
DE
RECHERCHE**

Projet de recherche

Titre : Recherche de marqueurs moléculaires synapomorphes spécifiques de souches chez *Trypanosoma cruzi* par la technique des “random primers”. Utilisation en épidémiologie.

Directeur : Dr. Michel Tibayrenc

1- Thème

Le laboratoire d'accueil a développé des études au long cours sur la variabilité subsécifique de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas (1,2,3). Par une approche de génétique des populations, il a été montré que les populations naturelles du parasite étaient composées de clones entre lesquels peuvent exister des différences génétiques considérables. Le modèle proposé implique que les clones naturels de *T. cruzi* sont stables dans l'espace et dans le temps même à l'échelle évolutive. Ces clones sont donc en fait assimilables à des lignées phylogénétiques distinctes, d'où leur grand intérêt en médecine et en épidémiologie. En effet, du fait de leur stabilité, ils peuvent être utilisés comme marqueurs pour le suivi des épidémies ("epidemiological tracking"). De plus, il semble (4) que les divergences évolutives considérables qui se sont accumulées entre certains d'entre eux aient un impact notable sur leurs propriétés médicalement importantes (virulence, résistance aux drogues).

Vue l'importance épidémiologique et médicale des clones naturels de *T. cruzi*, il serait précieux de disposer de marqueurs fiables et simples d'emploi pour les identifier dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques ou de protocoles expérimentaux. Une première approche a consisté à élaborer des sondes prenant pour molécule-cible la partie variable du minicercle de l'ADN kinétoplastique du parasite (5). La nouvelle technique des “random primers” (6,7) donne l'espoir de pouvoir rechercher systématiquement des marqueurs spécifiques de phylums donnés (caractères synapomorphes) avec de fortes chances de succès. En effet, chaque primer employé, pour une série de souches données, génère un polymorphisme spécifique. 800 primers différents sont actuellement commercialisés. Ceci fait que le pouvoir de résolution de la méthode est potentiellement illimité, et, en conséquence, il est possible de trouver par une recherche systématiques autant de fragments spécifiques de phylums qu'il est nécessaire.

2 - Population étudiée

L'étude portera sur un échantillonnage d'environ 50 souches de *Trypanosoma cruzi*, préalablement caractérisées par électrophorèse d'isoenzymes multilocus, et représentatives de la variabilité génétique totale du parasite. Des souches appartenant à d'autres espèces (*Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma cruzi marenkellei*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* spp. seront prises comme groupes externes (outgroups) pour vérifier la spécificité des marqueurs étudiés.

3 - Méthodologie employée

Une étude préliminaire portant sur 25 souches différentes de *T. cruzi* (8) a déjà permis l'inventaire d'un certain nombre de fragments d'amplification montrant une spécificité à différents niveaux de divergence phylogénique: l'un d'eux (primer A8 d'Operon Technologies) est monomorphe chez toutes les souches de *T. cruzi* testées. D'autres sont spécifiques de phylums (groupes de souches), d'autres, de génotypes individuels.

Cet inventaire a déjà été confirmé et complété dans le cadre du présent DEA, qui a permis par ailleurs à la candidate d'acquérir la technique RAPD, ainsi que les bases théoriques du modèle clonal chez *Trypanosoma cruzi*. Le but du projet présenté ici est:

- de mener une recherche systématique des fragments les plus intéressants en se basant sur un plus grand nombre de souches (préalablement caractérisées par marquage isoenzymatique multilocus et random primers avec nos techniques actuelles), et un large éventail de primers différents: il est prévu d'en tester 100.

- d'explorer en profondeur le polymorphisme éventuel des fragments sélectionnés comme spécifiques (c'est-à-dire: apparemment monomorphes en gel d'agarose pour une série de souches données), et leur valeur comme marqueurs phylogéniques et épidémiologiques.

Le fait que deux fragments apparaissent identiques sur gel d'agarose n'est pas une preuve que leurs séquences soient identiques, mais seulement une présomption que ces séquences soient similaires (9). Les fragments sélectionnés seront donc soumis aux analyses suivantes:

- électrophorèse sur gel de polyacrylamide, plus résolutive que l'électrophorèse sur gel d'agarose, et qui peut donc déjà révéler un polymorphisme additionnel (9).

- coupure des fragments élus par des enzymes de restriction et analyse RFLP, qui a déjà révélé un polymorphisme additionnel non négligeable de certains fragments RAPD synapomorphes (9).

- hybridation de fragments venant de différentes souches en utilisant comme sonde le fragment de l'une des souches: ceci donne déjà une idée du degré de parenté de séquence des différents fragments, et de la possibilité éventuelle de les utiliser comme sondes spécifiques d'espèce, de souches ou de groupes de souches en dépit d'un possible polymorphisme résiduel.

- clonage des fragments les plus intéressants, ce qui permettra de les produire en grande quantité en vue de leur séquenciation et de leur utilisation éventuelle comme sondes-diagnostic.

- séquenciation des fragments les plus prometteurs, ce qui donnera des informations phylogénétiques précieuses, et permettra de sélectionner des primers pour amplifier les séquences les plus spécifiques de manière à élaborer des marqueurs-diagnostic basés sur la méthode PCR (donc, ne demandant pas que la souche étudiée soit cultivée).

4- Collaborations

Le laboratoire est autonome pour cette recherche. La thèse se déroulera en concertation étroite avec d'autres études similaires menées au sein de l'équipe sur d'autres parasites (*Leishmania* spp.), ce qui permettra une bonne synergie entre plusieurs étudiants, et une utilisation optimum des moyens techniques.

5 - Cadre de l'étude

UMR CNRS/ORSTOM 9926: "Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs", centre ORSTOM de Montpellier.

6 - Financement du projet

Une demande de financement a été adressée au GREG. Une autre sera déposée dans le programme: "Parasite Genome/ Strategic Research" de l'OMS.

Références bibliographiques

- 1 - Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M. & Carlier, Y. 1981.
Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi*; implications taxinomiques.
Comptes Rendus de l' Académie des Sciences de Paris, **293**: 207-209.
- 2 - Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A. & Ayala, F.J. 1986.
Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas'disease, have a complex multiclonal structure.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **83**: 115-119.
- 3 - Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. 1988.
Isozyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance.
Evolution., **42** (2): 277-292.
- 4 - Laurent, J.P. 1994.
Comparaison des propriétés biologiques de différents clones naturels de *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agent de la maladie de Chagas.
Thèse de Doctorat d'Université, Université de Montpellier II.
- 5 - Brenière, S.F., Bosseno, M.F., Revollo, S., Rivera, M.T. & Tibayrenc, M. 1992.
Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and host blood by PCR technique.
American Journal of Tropical Medicine and Hygien, **46** (3): 335-341.
- 6 - Welsh, J. & McClelland, M. 1990.
Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.
Nucleic Acids Research, **18**: 7213-7218.
- 7 - Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. 1990.
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Research, **18**: 6531-6535.
- 8 - Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F. , Sarkeski, D. & Ayala, F.J. 1993.
Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity of random-primer DNA typing and multilocus isoenzyme electrophoresis.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **90**: 1335-1339.
- 9 - Bianciotto, J. 1994.
Valeur des fragments RAPD pour l'identification de l'espèce *Leishmania infantum*, agent de la Leishmaniose viscérale.
Maîtrise de Biochimie, Université de Montpellier II.