

## APPORT DE LA GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS AU PROBLÈME DU TYPAGE DES SOUCHES DE PARASITES.

TIBAYRENC MICHEL & BEN ABDERRAZAK SOUHA

Dans cet article, nous tenterons de montrer que la génétique des populations n'est pas seulement pour le parasitologue une discipline de «sciences fondamentales», mais qu'elle constitue en fait un détour obligé pour tout chercheur désireux de caractériser les souches de parasites (spécialement les micro-organismes) à l'aide des outils nouveaux apportés par la biochimie et la biologie moléculaire. Refuser ce détour équivaut à chercher à utiliser une machine complexe sans son mode d'emploi. Nous commencerons par résumer les principaux résultats obtenus par l'approche de génétique des populations, puis nous discuterons de leurs implications en épidémiologie et en médecine.

Des études au long cours de génétique des populations ont montré que plusieurs espèces majeures de protozoaires parasites (dont les *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Giardia duodenalis*, et *Entamoeba histolytica*) ont une structure de populations «clonale» ou «quasi-clonale»: c'est la «théorie clonale des protozoaires parasites» (Tibayrenc *et al.*, 1981, 1984, 1986; Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990). La spécificité de ce modèle n'est pas de dire que ces organismes sont capables de reproduction clonale: ceci était déjà bien connu à l'échelle du laboratoire. Ce qui n'avait jamais été éclairci, ni même considéré, était l'impact effectif, sur le long terme, du mode de reproduction de ces parasites sur la structure de leurs populations. Montrer l'existence de clones qui durent quelques heures au laboratoire est une observation banale. Montrer que ces clones sont capables de se propager sans changement génétique notable pendant des années, sur des milliers de kilomètres est tout à fait différent en termes de conséquences épidémiologiques, et ne peut se faire que par l'appro-

che spécifique de génétique des populations développée dans le cadre du modèle clonal.

Les arguments indirects (circumstantial evidence) en faveur d'une propagation clonale sont constitués par des écarts considérables par rapport aux prédictions de la loi de Hardy-Weinberg, et des déséquilibres de liaison importants (voir l'encadré 1 pour les termes spécialisés de génétique des populations). Les tests de déséquilibre de liaison sont plus fiables que ceux basés sur la loi de Hardy-Weinberg. En effet, ces derniers tests demandent que plusieurs conditions soient remplies: (i) les allèles de chaque génotype doivent être identifiables; (ii) la ploïdie de l'organisme doit être connue; (iii) l'organisme ne doit pas être haploïde. Dans beaucoup de cas, ces conditions ne sont pas remplies. Les tests de déséquilibre de liaison permettent de s'en affranchir totalement, ce qui les rend très robustes (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990).

*Plasmodium falciparum* semble présenter un cas très spécial: ce parasite est classiquement un organisme sexué, et il est très probable que la recombinaison génétique est un fait majeur de son cycle naturel. Cependant, par marquage isoenzymatique multigénique, nous avons observé (Ben Abderrazak, 1993) un déséquilibre de liaison notable dans 4 populations de ce parasite sur 5. Pour 3 de ces populations en déséquilibre, les conditions de sympatrie étaient satisfaisantes.

Ce résultat insolite confirme des analyses antérieures menées sur des données plus fragmentaires (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990; Tibayrenc *et al.*, 1991). Ils sont en désaccord avec l'hypothèse «potentiellement panmictique» proposée pour ce parasite (Walliker, 1985). Cette dernière hypothèse, en effet, stipule que l'espèce entière *P. falciparum* doit être considérée comme une seule communauté potentiellement panmictique, au sein de laquelle les obstacles au flux génique ne sauraient être que géographiques ou temporels (comme dans l'espèce humaine, par exemple). Les écarts importants à la

UMR CNRS ORSTOM 9926 : «Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs», ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France.

1. Adresse actuelle: Malaria Branch, Div. Parasitic Diseases, NCID, CDC, Mail Stop F-12, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA 30333, USA.

Bull. liais. doc. - OCEAC Vol.26 N°3 Septembre 1993

ORSTOM Fonds Documentaire

N° 39.075 ex 1

Cote : B

121

15 MARS 1994

P 17 253

panmixie que nous avons relevés sont compatibles avec l'hypothèse qu'un mode quelconque de reproduction uniparentale opère en plus du cycle sexué «normal». Cependant, il est important de souligner que le déséquilibre de liaison observé chez *P. falciparum* ne peut se comparer à ceux qu'on relève chez *Trypanosoma cruzi* ou chez *Leishmania* par exemple. Une propagation clonale occasionnelle chez *P. falciparum* pourrait s'expliquer simplement par de forts taux d'autofécondation (Dye, 1991). En effet, l'autofécondation chez un organisme haploïde génère des clones, dans l'acception de ce terme utilisée en génétique des populations (Tibayrenc & Ayala, 1991; voir l'encadré 1). Si de tels clones existent réellement chez *P. falciparum*, la question de leur stabilité dans l'espace et dans le temps (qui conditionne étroitement leur importance épidémiologique) est ouverte, et fait actuellement l'objet d'un débat (Day *et al.*, 1992). Il est une autre explication possible aux écarts à la panmixie observés chez ce parasite : c'est l'existence de deux ou plusieurs espèces cryptiques insoupçonnées au sein de *P. falciparum* (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990). L'état actuel des données ne permet pas de trancher.

Même chez les parasites pour lesquels la structure clonale est «évidente», le modèle que nous proposons ne stipule pas que la sexualité est absente, mais

seulement, qu'elle n'est pas suffisamment fréquente pour brouiller le tableau prédominant de structure clonale.

Figure 1 : Profils isoenzymatiques vus pour une enzyme monomérique

Génotypes: *a/a* homozygote *a/b* hétérozygote *b/b* homozygote

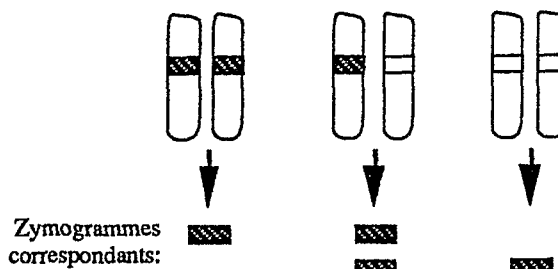
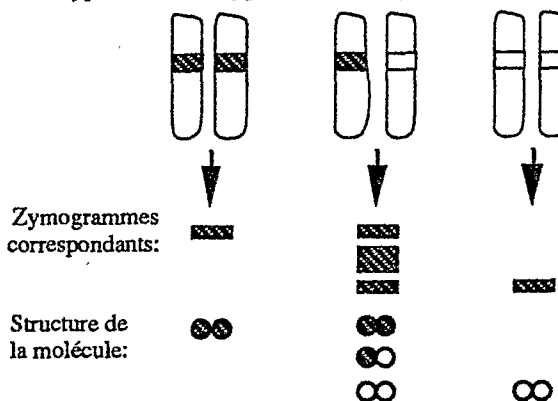


Figure 2 : Profils isoenzymatiques vus pour une enzyme dimérique

Génotypes: *a/a* homozygote *a/b* hétérozygote *b/b* homozygote



### ENCADRÉ 1 : PETIT MANUEL DE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS

**Gène :** Une séquence d'ADN codant pour un polypeptide donné. Plus généralement : n'importe quelle séquence d'ADN déterminée. Ce sens large, pas trop orthodoxe, est celui qui est utilisé dans les présents tests de génétique des populations.

**Haploïde :** Dans l'organisme étudié, chaque chromosome (et donc chaque gène) existe en un seul exemplaire. L'état haploïde est souvent noté : «1N», ou «N» dans les articles.

**Diploïde :** Dans l'organisme étudié, chaque chromosome (et donc chaque gène) existe en deux exemplaires. Beaucoup d'organismes «supérieurs» (dont l'Homme) sont diploïdes. L'état diploïde est fréquemment noté : «2N» dans les articles.

**Aneuploïde :** Le nombre d'exemplaires est différent d'un chromosome à l'autre (cf. la trisomie 21, ou mongolisme, dans laquelle le chromosome 21 est en 3 exemplaires).

**Allèle (s) :** Formes moléculaires différentes d'un même gène.

**Homozygote :** Chez un individu appartenant à une espèce diploïde, les deux exemplaires d'un gène donné présentent exactement la même structure moléculaire (voir Figures 1 et 2).

**Hétérozygote :** Chez un individu appartenant à une espèce diploïde, les deux exemplaires d'un gène donné présentent une structure moléculaire différente : cet individu recèle deux allèles différents du même gène (voir Figures 1 et 2).

**Fréquence allélique :** C'est le rapport : effectif observé d'un allèle donné / nombre total d'allèles dans une population donnée. Considérons un exemple numérique. Dans une population de drosophiles (les drosophiles sont diploïdes et sexuées), on étudie un gène donné pour lequel on enregistre l'existence de deux allèles, a et b. Sur 100 individus, on note la présence de 36 génotypes homozygotes *a/a*, 16 génotypes homozygotes *b/b*, et 48 hétérozygotes *a/b*. Étant donné que l'organisme est diploïde, sur 100 individus, il y a 200 allèles. Chez un homozygote *a/a*, il y a 2 exemplaires de l'allèle a. Chez un homozygote *b/b*, il y a 2 exemplaires de l'allèle b. Chez un hétérozygote *a/b*, il y a un seul allèle a, et un seul allèle b. L'effectif total des allèles a est donc : deux fois le nombre d'individus *a/a* (36 X 2), plus le nombre d'individus *a/b*. Il y a donc 120 allèles a. La fréquence de cet allèle est : 120 / 200 = 0,6. De même, le nombre total d'allèles b est : deux fois le nombre d'individus *b/b* (16 X 2), plus le nombre d'individus *a/b*, = 80. La fréquence de cet allèle est : 80 / 200 = 0,4.

Cette nuance est importante. En effet, des phénomènes de recombinaison intermittents pourraient avoir un impact profond sur le devenir des clones à l'échelle évolutive. Cet impact, qui pourrait être variable d'une espèce à l'autre, et même, d'un cycle écologique à l'autre au sein d'une même espèce, conditionne la stabilité des clones sur le long terme, et donc, leur importance médicale et épidémiologique: plus les clones sont stables, plus ils se comportent comme des taxons (des «pseudoespèces»).

Le modèle clonal, qui accepte une certaine «dose de sexe», est ainsi parfaitement compatible avec les phénomènes de sexualité observés ou soupçonnés chez *Trypanosoma brucei* et *Leishmania*, par exemple (Jenni *et al.*, 1986, Bastien, Blaineau & Pagès, 1992 ; Lanotte & Rioux, 1990). La véritable question n'est pas : «y a-t-il sexe ou pas?», mais : «quel est l'impact réel du sexe sur la structure des populations naturelles de ces parasites ?». L'approche de génétique des populations et le modèle clonal s'inquiètent en fait assez peu des mœurs sexuelles des parasites, et se focalisent bien davantage sur la structure de leurs populations.

Nous avons déjà dit deux mots des implications de ces résultats pour l'épidémiologie et la médecine. Elles apparaissent clairement (voir Table 1): plus il y a de sexe, et plus les génotypes de ces parasites sont

instables. Dans le modèle potentiellement panmictique (Walliker, 1985), ils ne durent qu'une génération ou au mieux, un petit nombre de générations, après quoi leur «personnalité génétique» se dilue dans le pool commun. Selon un tel modèle, il est donc absurde de chercher à caractériser les souches de parasites dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. En revanche, si la recombinaison génétique est rare ou absente, les génotypes se propagent virtuellement identiques à eux-mêmes, et il est donc licite et souhaitable de les «typer», c'est-à-dire de les caractériser, puisqu'ils sont stables dans l'espace et dans le temps.

La démarche de «typer» les souches de parasites revient donc en fait à une prise en compte implicite (le plus souvent inconsciente) du modèle clonal.

L'opposition modèle panmictique/modèle clonal a également des implications considérables en taxonomie (Table 1) : même si les résultats actuels demandent à être raffinés, nous savons amplement assez pour dire que la majorité des protozoaires parasites de l'homme ne sont pas des animaux sexués «normaux». Ceci doit conduire à rejeter formellement dans leur cas le concept biologique de l'espèce (Mayr, 1940), qui repose sur le critère d'interfécondité. On doit alors s'en tenir à cette catégorie arbitraire qu'est «l'agamospecies», c'est-à-dire l'espèce définie

#### ENCADRÉ 1 : PETIT MANUEL DE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS (SUITE)

Étant donné qu'il y a seulement deux allèles différents dans cette population pour ce gène, ce dernier résultat aurait pu se déduire de la façon suivante : fréquence de  $b = 1$  moins fréquence de  $a$ ,  $= 1 - 0,6 = 0,4$ .

**Locus :** C'est la localisation physique d'un gène donné sur le chromosome. Par extension, dans le jargon des généticiens des populations, le terme «locus» désigne en fait souvent le gène lui-même.

**Clone, clonal, clonalité :** Une propagation «clonale» n'est pas synonyme de propagation «mitotique». En génétique des populations, on parle de clones toutes les fois que les individus d'une lignée donnée sont génétiquement identiques entre eux, et à l'individu parental (Tibayrenc & Ayala, 1991). A part la reproduction mitotique, ceci s'observe dans plusieurs types de parthénogenèse, et aussi, dans le cas d'une autofécondation chez un organisme haploïde. Ceci fait qu'on peut observer une structure clonale chez des animaux montrant une méiose, et même, des copulations. Du point de vue de la génétique des populations, le terme de clonalité met l'emphase davantage sur la structure des populations que sur les mœurs sexuelles.

**Tests de clonalité :** L'hypothèse nulle de tous les tests conçus pour mettre en évidence une clonalité est que, dans la population étudiée, les échanges gé-

nétiques se font au hasard («panmixie»). Des écarts importants par rapport aux prédictions de la panmixie peuvent donc être considérés comme des arguments indirects («circumstantial evidence») en faveur d'une inhibition des échanges géniques dans la population à l'étude.

Les deux conséquences fondamentales des échanges sexués sont la ségrégation des allèles à un locus donné, et la recombinaison des génotypes d'un locus à l'autre.

**Ségrégation, équilibre de Hardy-Weinberg :** La ségrégation désigne la réassociation des allèles à un locus donné. Ce phénomène s'explique par les réassortiments qui prennent place au moment de la méiose. La libre ségrégation des allèles est vérifiée par la loi dite de Hardy-Weinberg. Considérons le cas d'une population panmictique chez un organisme diploïde. 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 les fréquences de chacun des 3 génotypes possibles, à savoir  $a/a$ ,  $a/b$  et  $b/b$  seront respectivement de  $p^2$ ,  $2pq$  et  $q^2$ . Tel est le cas de la population décrite au paragraphe : «fréquence allélique». Si les fréquences observées sont statistiquement différentes des fréquences attendues, c'est là un argument pour dire que les flux géniques sont inhibés dans cette population.

Table 1 : Résumé des implications respectives du modèle «potentiellement panmictique» et du modèle «clonal» en épidémiologie, et en taxonomie des protozoaires parasites.

	SEXE FREQUENT ou USUEL (le modèle «potentiellement «panmictique»	SEXE RARE ou ABSENT (le modèle «clonal»)
Utilisation des génotypes (zymodèmes, schizodèmes, RAPDdèmes, etc) comme unités taxonomiques pour : - Enquêtes épidémiologiques - Immunologie - Elaboration de vaccins et de drogues - Etudes cliniques	INTERDITE : ces génotypes sont INSTABLES, et durent seulement une génération ou un petit nombre de générations.	AUTORISÉE ET RECOMMANDÉE : les génotypes sont stables pendant des années, voire à l'échelle évolutive.
Concept d'espèce chez les protozoaires parasites.	CONCEPT MIXOLOGIQUE (homme, drosophiles, etc). Les espèces sont des unités potentiellement panmictiques, isolées génétiquement des autres espèces.	AGAMOSPÉCIES, aux limites arbitraires. Bases possibles de description* : - Divergence phylogénique (cf <i>Giardia</i> ) - Propriétés biologiques et médicales spéciales ( <i>Shigella</i> et <i>Escherichia coli</i> ). - Combinaison des deux approches : divergences phylogéniques + caractères médicaux ( <i>Entamoeba histolytica</i> ).

\* Voir discussion détaillée dans Tibayrenc (1993).

#### ENCADRÉ 1 : PETIT MANUEL DE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS (SUITE)

**Recombinaison, déséquilibre de liaison :** La recombinaison est le phénomène qui se traduit par la réassociation des différents génotypes d'un locus à l'autre. De même que la ségrégation, elle est le résultat de la méiose (disjonction au hasard des tétrades et crossing-over). En cas de panmixie (libre recombinaison), la probabilité attendue d'un génotype multilocus donné est le produit des probabilités observées des génotypes unilocus qui le composent (par exemple, dans une population humaine panmictique, si la fréquence du groupe sanguin AB est de 0,3, et celle du groupe sanguin Rh (+) est de 0,7, la fréquence des individus qui sont à la fois AB et Rh (+) est  $0,3 \times 0,7 = 0,21$ . Une inhibition de la recombinaison aboutit à un déséquilibre de liaison, ou association non randomique entre loci (les prédictions des probabilités attendues pour les génotypes multilocus ne sont plus remplies). Par exemple, si la fréquence des individus AB et Rh (+) était de 0,8 au lieu de 0,21, ceci indiquerait que les deux loci sont liés l'un à l'autre (ils ne sont pas transmis indépendamment l'un de l'autre).

**Tests de recombinaison spécifiques :** Plusieurs tests complémentaires ont été proposés (Tibayrenc, Kjellberg & Ayala, 1990) pour explorer différentes conséquences du déséquilibre de liaison. Tous ces tests

prennent pour hypothèse nulle une situation parfaitement panmictique. Ils sont résumés ci-après :

**d1 :** est la probabilité combinatoire d'échantillonner tel génotype (qu'on soupçonne d'être sur-représenté) avec un effectif égal ou supérieur à celui qui est effectivement observé. Cette probabilité  $P$  est donnée par la formule

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

dans laquelle  $x$  = probabilité attendue du génotype multilocus, telle que définie plus haut (produit des fréquences observées des génotypes unilocus qui le composent) ;  $n$  = nombre d'individus échantillonnés ; et  $m$  = nombre d'individus de l'échantillon qui possèdent ce génotype particulier.

Ce test est basé sur le fait qu'en cas de reproduction clonale, les génotypes se reproduisent inchangés d'une génération à l'autre comme des photocopies : certains d'entre eux seront donc représentés en excès par rapport aux prévisions panmictiques.

**d2 =** probabilité d'observer n'importe quel génotype avec un effectif égal ou supérieur à celui du génotype le plus abondant dans l'échantillon.

sans le secours du critère d'interfécondité. Le fait que la description des agamospecies soit une question de convenance ne doit pas conduire à renoncer à un effort taxonomique indispensable. Il faut simplement être bien conscient du fait que ces «espèces» n'ont pas le même statut biologique que les «vraies» espèces, et s'entendre clairement sur les bases retenues pour les décrire (Tibayrenc, 1993).

Pour des raisons didactiques, la Table 1 montre une opposition polarisée entre les deux modèles, opposition qui pourrait se montrer artificielle dans certains cas : il faut bien être conscient qu'entre ces deux modèles extrêmes, tout un continuum de cas possibles pourrait s'observer. Dans son état actuel, la génétique des populations ne fournit pas d'outils fiables pour explorer de façon rigoureuse de telles situations intermédiaires. C'est là le défi que devront relever ces recherches dans les années à venir.

## RÉFÉRENCES

- Bastien, P., Blaineau, C. & Pagès, M. 1992. Leishmania: sex, lies and karyotypes. *Parasitol. Today*, 8 :174-177.
- Ben Abderrazak, Souha. 1993. Variabilité génétique des populations de *Plasmodium falciparum*. PhD dissertation, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- 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. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*: 46 (3): 335-341.
- Cruz, A.K., Titus, R. & Beverley, S.M. 1993. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90: 1599-1603.
- Day, K.P., Koella, J.C., Nee, S., Gupta, S. & Read, A.F. 1992. Population genetics and dynamics of *Plasmodium falciparum* : an ecological view. *Parasitology*, 104 : 335-352.
- Dye, C. 1991. Population genetics of nonclonal, non random ly mating malaria parasites. *Parasitol. Today*, 7 : 236-240.
- Evans, D.A., Smith, V., Killich-Kendrick, R., Neal, R.A. & Peters, W. 1989. Evidence for hybrid formation in the genus *Leishmania*. In: Hart, D.T. (ed.), *Leishmaniasis : the current status and new strategies for control*. Plenum Press, New York, New York, pp. 685.

### ENCADRÉ 1 : PETIT MANUEL DE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS (FIN)

Cet test repose sur le même principe que le précédent.  $e$  = probabilité d'observer un nombre de génotypes différents égal ou inférieur à celui qui est effectivement observé dans l'échantillon. En cas de reproduction asexuée, du fait que ségrégation et recombinaison sont inhibées, on s'attend à ce que le nombre total de génotypes soit diminué par rapport à une population sexuée. Ceci n'est pas obligatoirement le cas, car la variabilité clonale peut être considérable.

$f$  = probabilité d'observer un niveau statistique de déséquilibre de liaison aussi élevé que celui qui est effectivement observé dans l'échantillon. Cette mesure statistique de déséquilibre de liaison se fait selon des indices classiques (voir Zhang, Tibayrenc & Ayala, 1988).

$d_2$ ,  $e$  et  $f$  sont basés sur des simulations de Monte Carlo, avec  $10^4$  itérations.

**Biaisages possibles :** Ces tests ne sont pas des preuves directes de propagation clonale, mais de simples indications d'écarts à la panmixie. D'autres facteurs pourraient rendre compte des résultats en interrompant le flux génique au sein des populations étudiées. Ils sont brièvement résumés ci-après :

Obstacles physiques au flux génique : des séparations géographiques, ou temporelles, ou une combinaison des deux, interrompent le flux génique et génèrent des différences de fréquences alléliques d'une population à l'autre. Ceci conduit automatiquement à des écarts par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg et à un déséquilibre de liaison.

Sélection naturelle : elle peut moduler les fréquences alléliques (en favorisant certains allèles au détriment d'autres), et ainsi, modifier les prédictions de la panmixie.

Spéciation biologique cryptique (spéciation «vraie»: Mayr, 1940). S'il y a deux ou plusieurs espèces biologiques cryptiques (insoupçonnées) dans l'échantillon, les résultats pourraient mimer une clonalité, alors que ces espèces sont de «vraies» espèces (sexuées).

Une analyse qualitative soignée des données permet généralement de distinguer une propagation clonale de ces diverses situations. Pour plus de détails, voir Tibayrenc *et al.*, 1991.

- Guerrini, Françoise. 1993. Génétique des populations et phylogénie des *Leishmania* du Nouveau-Monde. PhD dissertation, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart, B., Le Page, R.W.F., Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E. & Steinert, M. 1986. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, 322 : 173-175.
- Lanotte, G., Rioux, J.A. & Serres, E. 1986. Approche cladistique du genre *Leishmania* (Ross, 1903). A propos de 192 souches de l'Ancien Monde. Analyse numérique de 50 zymodèmes identifiés par 15 enzymes et 96 isoenzymes. *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. Int. CNRS/INSERM, 1984). IMEEE, Montpellier, 1986: 27-40.
- Lanotte, G. & Rioux, J.A. 1990. Fusion cellulaire chez les *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (Cell fusion in *Leishmania*). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 310 : 285-288.
- Mayr, E. 1940. Speciation phenomena in birds. *Am. Nat* 74 : 249-278.
- Tibayrenc, M. 1993. *Entamoeba*, *Giardia* and *Toxoplasma* : clones or cryptic species ? *Parasitol. Today* 9 (3) : 102-105.
- Tibayrenc, M. & Ayala, F.J. 1991. Towards a population genetics of microorganisms : the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*: 7 (9): 228-232.
- Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M. & Carlier, Y. 1981. Arguments génétiques contre l'existence d'une sexualité actuelle chez *Trypanosoma cruzi* ; implications taxinomiques. (Genetic evidence against sex at present in *Trypanosoma cruzi* ; taxonomical implications). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 293 : 207-209.
- Tibayrenc, M., Echalar, L., Dujardin, J. P., Poch, O. & Desjeux, P. 1984. The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in Southern Bolivia. New isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 78 : 519-525.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenière, S.F., Dardé, M.L. & Ayala, F.J. 1991. Are eucaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* : 88 : 5129-5133.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F. & Ayala, F.J. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa : the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma*, and its medical and taxonomical consequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* : 87 : 2414-2418.
- 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. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 83 : 115-119.
- Walliker, D. 1985. Characterization of *Plasmodium falciparum* of different countries. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 65 : 69-77.