



Institut français de recherche scientifique
pour le développement en coopération



ANALYSE GÉNÉTIQUE
D'ISOLATS NATURELS SUD-AMÉRICAINS
DE *LEISHMANIA*
MONTRANT DE POSSIBLES PHÉNOMÈNES
DE RECOMBINAISON

Anne-Laure BAÑULS

Document Orstom Montpellier, 1994, n° 7

Anne-Laure BAÑULS

ANALYSE GÉNÉTIQUE
D'ISOLATS NATURELS SUD-AMÉRICAINS
DE *LEISHMANIA*
MONTRANT DE POSSIBLES PHÉNOMÈNES
DE RECOMBINAISON

**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 Anne-Laure Bañuls du diplôme d'études approfondies de parasitologie de l'université des sciences et techniques du Languedoc-Montpellier II, le 9 juillet 1993.

© Orstom, 1994, Centre de Montpellier

Université Montpellier II

Diplôme d'Etudes Approfondies de Parasitologie

Mémoire de stage

Analyse génétique d'isolats naturels sud-américains de *Leishmania* montrant de possibles phénomènes de recombinaison

Présenté par Anne-Laure BAÑULS, le 9 juillet 1993

Laboratoire d'accueil : UMR CNRS - ORSTOM 9926 "Génétique Moléculaire
des Parasites et des Insectes Vecteurs" Directeur : Dr Michel Tibayrenc
Centre de Recherche ORSTOM
Responsable de stage : Dr Michel Tibayrenc

Résumé

Le présent travail visait en premier à éclaircir la nature biologique de deux séries de stocks de *Leishmania* qui avaient été suspectés par d'autres auteurs comme montrant des phénomènes d'échanges sexuels naturels.

La première série concerne 30 stocks du Pérou, qui semblait comprendre des génotypes parentaux et des génotypes recombinants d'après l'analyse en champ pulsé. L'analyse par électrophorèse d'isoenzymes multilocus et par amplification de l'ADN par amorces aléatoires (RAPD) ne corrobore pas cette hypothèse. Le statut de génotypes parentaux et recombinants inférés par l'analyse en champ pulsé est incompatible avec nos résultats. Les variabilités révélées par champ pulsé d'une part, isoenzymes et RAPD d'autre part, montrent des résultats profondément divergents.

La deuxième série concerne 31 stocks d'Equateur, dont 5 sont déterminés par l'analyse isoenzymatique comme étant des hybrides entre *Leishmania panamensis* et *Leishmania braziliensis*. Les résultats RAPD sur 4 de ces stocks sont tout à fait en accord avec cette hypothèse. Les profils montrent souvent une addition des bandes parentales, mais ce n'est pas toujours une combinaison parfaite des deux. En effet, pour certains primers, nous observons soit l'absence de certaines bandes parentales, soit des bandes surnuméraires. Ceci montre que les profils recombinants ne sont pas le résultat d'un simple mélange de stocks, et suggère par ailleurs que les phénomènes impliqués ne suivent pas un schéma mendélien classique (recombinaison de l'ensemble du génome).

Ce travail a permis par ailleurs de mieux cerner la valeur de la méthode RAPD pour la caractérisation des souches de *Leishmania*. La résolution de cette nouvelle technique apparaît supérieure à celle de l'électrophorèse d'isoenzymes, quoique les résultats obtenus par les deux approches soient concordants. Les deux méthodes apparaissent complémentaires l'une de l'autre.

Enfin, notre étude apporte des informations complémentaires sur la variabilité génétique des *Leishmania* au Pérou et en Equateur.

Summary

The present work aimed first to clarify the biological nature of two sets of *Leishmania* stocks which had been suspected by other authors to show events of natural genetic exchanges.

The first set involves 30 Peruvian stocks, which seemed to include both parental and recombinant genotypes according to pulse field gel electrophoresis (PFGE) results.

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) and random amplification of polymorphic DNA (RAPD) do not support this hypothesis. The status of parental and recombinant genotypes inferred by PFGE is inconsistent with our results. The variabilities revealed by PFGE on the one hand, MLEE and RAPD on the other hand, appear as drastically divergent.

The second set involves 31 Ecuadorian stocks, five from them identified by MLEE as hybrids between *Leishmania panamensis* and *Leishmania braziliensis*. The RAPD results are in full agreement with this hypothesis. The profiles recorded frequently show an addition of parental bands. But it's not all the time a perfect combination. Indeed, some primers show additional bands or the absence of some parental bands. This shows that (i) the recombinant profiles are not the result of a mere mixture of stocks; (ii) the phenomena involved might not follow a classical Mendelian mechanism (recombination of the whole genome).

Besides, this work made it possible to better estimate the relevance of the RAPD method for *Leishmania* stock characterization. The resolution of this new technique appears as higher than MLEE, although the results obtained by the two approaches corroborate one another. The two methods appear as complementary to one another.

Lastly, our study brings additional information on genetic variability of *Leishmania* in Peru and Ecuador.

Table des matières

Résumé

Summary

I. Introduction	1
II. Généralités	3
2.1. La notion de clone naturel et son caractère relatif	3
2.2. Impact réel des échanges génétiques sur le plan épidémiologique	3
2.3. Notion d'espèce	3
2.4. Taxonomie	4
III. Matériel et méthodes	5
3.1. L'électrophorèse isoenzymatique	5
3.1.1. Généralités	5
3.1.2. Matériel biologique	5
3.1.3. Technique électrophorétique	8
3.1.4. Interprétation des résultats	9
3.2. RAPD	9
3.2.1. Généralités	9
3.2.2. Matériel biologique	10
3.2.3. Extraction d'ADN	10
3.2.4. La technique RAPD	11
3.2.4.1. Réactifs et matériel	11
3.2.4.2. Amplification et visualisation des bandes	12
3.3. Les méthodes d'analyse des résultats	13
3.3.1. Distance phénétique ou Distance de Jaccard	13
3.3.2. Dendrogramme	13
3.3.3. Analyse du mode de reproduction du parasite	13
IV. Résultats	16
4.1. Les stocks du Pérou	16
4.1.1. Résultats isoenzymatiques	16
4.1.1.1. Lecture et interprétation des zymogrammes	16
4.1.1.2. Les zymodèmes	16
4.1.1.3. Tests de génétique des populations	16
4.1.1.4. Etudes des relations phénétiques : dendrogramme	17
4.1.2. Résultats de l'analyse RAPD pour les échantillons du Pérou	18
4.1.2.1. Lecture des profils RAPD	18
4.1.2.2. Les RAPDèmes	18
4.1.2.3. Les tests de génétique des populations	18
4.1.2.4. Etudes des relations phénétiques : Dendrogramme	19

4.1.3. Comparaison des résultats isoenzymatiques et RAPD pour les stocks du Pérou	19
4.2. Les stocks d'Equateur	22
4.2.1. Les isoenzymes	22
4.2.1.1. Les zymogrammes	22
4.2.1.2. Les zymodèmes	22
4.2.1.3. Les tests de génétique des populations	22
4.2.1.4. Etude des relations phénétiques : dendrogramme	24
4.2.1.5. Les hybrides putatifs	24
4.2.2. Résultats de la méthode RAPD pour les souches hybrides	26
V. Discussion	27
5.1. Les hybrides putatifs	27
5.1.1. Au Pérou	27
5.1.2. En Equateur	27
5.2. Valeur de la méthode RAPD	29
VI. Conclusion	30
VII. Projet de recherche	31
7.1. Projet	31
7.2. Zone d'étude	32
7.3. Techniques	32
7.4. Analyse de génétique des populations	32
7.5. Echancier	33
7.6. Financement	33
Bibliographie	34
Annexes	

I Introduction :

La leishmaniose existe sur tous les continents, sauf en Australie et en Antarctique. Elle pose d'importants problèmes de santé publique. En 1989, l'OMS a évalué à 350 millions environ le nombre de personnes exposées à l'endémie, et à 12 millions le nombre de personnes infectées. La taxonomie des *Leishmanias* a été établie au départ sur des critères extrinsèques, et a été affinée par la suite grâce des critères intrinsèques. Mais la taxonomie pose encore de nombreux problèmes, tant aux niveaux spécifique que subs spécifique. En effet, l'introduction des marqueurs "modernes", biochimiques et moléculaires, a soulevé de nouvelles questions, et en particulier : quel est le statut biologique des génotypes mis en évidence par les isoenzymes ("zymodèmes") ou par l'analyse du polymorphisme de restriction de l'ADN ("schizodèmes")? Pour répondre à de telles questions, il est nécessaire de considérer le mode de reproduction du parasite dans ses cycles naturels. En effet, si les *Leishmania* sont des organismes normalement sexués, cela entraîne deux conséquences sur le plan taxonomique :

- les génotypes individualisés par les marqueurs moléculaires ne correspondent qu'à des variants individuels : ils sont instables, et ne durent qu'une génération, ou un petit nombre de générations. Ils n'ont aucune valeur taxonomique.

- les espèces leishmaniennes doivent être définies selon le critère classique d'interfécondité (1). Les observations de laboratoires ont montré clairement que les *Leishmania* ont un mode de reproduction mitotique. Mais en fait, les conséquences de leur mode de reproduction sur la structure de leurs populations naturelles restent inconnues.

Par une analyse de génétique des populations d'après les données de la littérature, Tibayrenc, Kjellberg & Ayala (2) ont postulé que les *Leishmania*, comme plusieurs autres espèces parasitaires majeures, présentaient une structure populationnelle clonale. Ceci implique, non pas que ces organismes sont capables de division mitotique, mais que leurs populations naturelles sont composées de clones stables dans l'espace et dans le temps, capables de se répandre virtuellement identiques à eux-mêmes sur de vastes aires géographiques et de longs intervalles de temps.

Cependant, plusieurs auteurs ont publié des données suggérant des phénomènes sexués dans les populations naturelles (3; 4; 5). Ces résultats sont souvent apparus comme une réfutation de l'hypothèse clonale.

La contradiction n'est en fait qu'apparente : le modèle clonal ne postule pas que la recombinaison génétique est absente mais simplement, qu'elle n'est pas suffisamment fréquente pour brouiller le tableau prévalent de structure clonale.

La question n'est pas : "y a t-il du sexe ou non?", mais plutôt : "quel est l'impact réel de la reproduction sexuée sur les populations naturelles du parasite?"

Dans le cadre de ces débats, notre présent travail porte principalement sur deux séries d'échantillon sur lesquels d'autres auteurs ont suspecté la présence d'"hybrides naturels". Le premier échantillon est une série de 34 stocks du Pérou, chez lesquels Dujardin et al. (sous

presse) ont inféré, par électrophorèse en champ pulsé, la présence de génotypes "parentaux" et de génotypes "recombinants". Il s'agirait donc d'un phénomène analogue à celui qu'ont décrit Bastien, Blaineau et Pagès (5) dans le cas de *Leishmania infantum*. Le deuxième échantillon est une série de stocks d'Equateur, dans laquelle Guerrini (6), par analyse isoenzymatique, a décrit 5 stocks comme des hybrides possibles entre *Leishmania panamensis* et *L. braziliensis*. Il s'agirait donc d'un phénomène biologique analogue à celui décrit par Evans et al. (3) en Arabie Saoudite.

Nous avons tenté dans ce travail d'éclaircir le statut biologique de ces génotypes hybrides supposés par une analyse isoenzymatique multilocus et par amplification de l'ADN par amorces aléatoires (random amplified polymorphic DNA ou RAPD).

Notre travail a permis par ailleurs :

- de tester la valeur de cette dernière méthode comme outil de caractérisation génétique des souches de *Leishmania*,
- de faire progresser nos connaissances, d'une façon plus générale, sur la variabilité génétique des souches d'Equateur et du Pérou.

Ce travail est donc focalisé sur le problème de la recombinaison génétique dans les populations naturelles de *Leishmania*. Par ailleurs, il apporte des informations supplémentaires sur la variabilité génétique des *Leishmania* au Pérou et en Equateur, mais les implications épidémiologiques de cette variabilité ne seront pas considérées dans le cadre de ce travail . Ces aspects seront développés dans notre projet de thèse.

II Généralités :

2.1. La notion de clone naturel et son caractère relatif :

Dans la terminologie en usage en génétique des populations, un clone est une population d'individus génétiquement identiques entre eux et identiques à l'individu parental. Une telle définition est compatible avec plusieurs modes de reproduction différents :

- division mitotique (clonalité au sens "strict")
- parthénogénèse apomictique
- certaines formes de parthénogénèse automictique
- autofécondation chez un organisme haploïde, ou chez un organisme homozygote à tous ses loci.

En fait, les clones "vrais" sont sans doute rares dans la nature, du fait du taux de mutations très élevé des séquences non codantes hautement répétées du génome. Il faut donc relativiser la notion de clone : telle collection d'organismes qui apparaissent tous identiques en utilisant telle batterie de marqueurs génétiques montrera une hétérogénéité si l'on augmente le pouvoir de résolution de la technique employée. Les "clones" mis en évidence par une série forcément limitée de marqueurs doivent être plutôt regardés comme des familles de clones étroitement apparentées (7).

Tibayrenc, Kjellberg & Ayala ont proposé le terme de "clonet" pour désigner, dans le cadre d'une espèce à reproduction clonale, les individus qui apparaissent identiques entre eux sur la base d'une série donnée de marqueurs génétiques.

2.2. Impact réel des échanges génétiques sur le plan épidémiologique :

La fréquence des échanges génétiques conditionne le statut des génotypes. Si les échanges sexuels sont fréquents et même obligatoires, comme il est postulé chez *Plasmodium falciparum* (8), les génotypes caractérisés par marquage multigénique ne durent qu'une génération ou qu'un petit nombre de générations. Donc, après une génération, leur personnalité génétique "se dilue". Ce modèle est identique en fait à celui qui est retenu pour les organismes supérieurs (l'Homme, par exemple). Si l'on accepte un tel modèle dans le cas des protozoaires parasites, les génotypes, du fait de leur extrême instabilité, ont peu ou pas de valeur comme marqueurs épidémiologiques. Si par contre, les échanges génétiques sont rares ou absents, les génotypes vont persister inchangés ou avec peu de modifications pendant des années, voire à l'échelle évolutive. Ils constitueront alors des outils performants pour le suivi des traînées épidémiologiques ("epidemiological tracking").

2.3. Notion d'espèce :

La notion biologique de l'espèce définie par Mayr (1) repose sur le critère d'interfécondité. Il ne s'applique donc que dans le cas d'espèces sexuées. Les espèces caractérisées indépendamment de ce critère d'interfécondité (cas des bactéries ou des animaux parthénogénétiques) ont un tout autre

statut biologique que les espèces sexuées "vraies". Ces "agamospecies" ont des limites purement arbitraires et n'ont pas de définition biologique rigoureuse. Le débat actuel sur le mode de reproduction chez les *Leishmania* a donc une importance centrale pour la question de la notion d'espèce chez ces parasites. Si l'on postule que ces parasites suivent le modèle "potentiellement panmixtique" (cas de *Plasmodium falciparum*), il faut leur appliquer la notion biologique de l'espèce, basée sur le critère d'interfécondité (1). Si par contre, l'on considère ce modèle potentiellement panmixtique comme douteux, la définition des espèces leishmaniennes devient une simple question de convenance.

2.4. Taxonomie :

Les *Leishmania* sont des protozoaires flagellés de l'ordre des *Kinetoplastida* et de la famille des *Trypanosomatidae* (selon la classification des *Leishmania* O.M.S. 1990). La taxonomie a été établie au départ sur des critères extrinsèques comme les caractéristiques épidémiologiques, la pathogénicité, la localisation chez le vecteur, etc...

Le genre *Leishmania* a été défini selon la spécificité d'hôte par Ross en 1903. Les *Leishmania* sont des parasites à cycle hétéroxène comprenant deux hôtes successifs obligatoires : les vertébrés comme réservoirs (des mammifères pour le genre *Leishmania*, et des reptiles pour le genre *Sauroleishmania*), et le phlébotome comme vecteur (Diptère Nématocère hématophage).

Deux sous-genres ont été définis en fonction du mode de développement chez le vecteur (9) :

- le sous genre *Leishmania* décrit par Saf'janova en 1982, et défini par son développement suprapylorique chez le vecteur (10).

- le sous genre *Viannia* décrit par Lainson et Shaw en 1987 (11), et défini par son développement péripylorique chez le vecteur.

Cette distinction a été corroborée par d'autres critères intrinsèques.

Les *Leishmania* sont ensuite distribuées en complexes d'espèces, puis en espèces. Cette classification a été établie selon la géographie, la forme clinique (il existe trois formes majeures : leishmaniose viscérale, leishmaniose cutanée et leishmaniose cutanéomuqueuse), et divers critères intrinsèques (méthodes immunologiques, électrophorèse d'isoenzymes et analyse de l'ADN).

Au Pérou, on rencontre des *Leishmania* appartenant au complexe *braziliensis* : *Leishmania peruviana*, et *Leishmania braziliensis*. Ces parasites peuvent provoquer deux formes cliniques différentes : l'Uta qui est une forme essentiellement cutanée, et l'Espundia qui est une forme cutanée à complication cutanéomuqueuse. *Leishmania guyanensis* a été également retrouvée dans ce pays (6). Ce parasite est responsable d'une forme clinique tégumentaire (nommée "Pian bois" en Guyane Française). Un cas de Leishmaniose cutanée diffuse a été décrite au Pérou. Elle serait provoquée par des leishmanies appartenant au complexe *mexicana*, *Leishmania amazonensis* (12).

En Equateur aussi, plusieurs espèces sont susceptibles d'être isolées : *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* (13) et *L. equatorensis*, une nouvelle espèce isolée chez des paresseux, que l'on a classée dans le complexe *braziliensis* (14).

III Matériel et méthodes :

3.1. L'électrophorèse isoenzymatique :

3.1.1. Généralités :

Par cette méthode, on étudie la migration d'enzymes dans un champ électrique. Le terme d'isoenzymes désigne des protéines présentant la même fonction enzymatique mais de mobilité différente en électrophorèse. Cette variabilité traduit une différence de charge électrique globale de la molécule, reflet de la variation de la structure primaire de la protéine. Ce polymorphisme isoenzymatique résulte des variations nucléotidiques du gène.

Les isoenzymes permettent donc indirectement de mettre en évidence des variations dans la structure du génome.

Pour une enzyme en particulier, l'obtention de profils différents (zymogrammes) peut correspondre à deux cas (15; 16) :

- soit il s'agit d'une enzyme codée par des allèles différents d'un même gène, ou alloenzymes.
- soit chaque isoenzyme est codée par deux loci différents d'un même gène.

Les zymogrammes obtenus sont dans la mesure du possible interprétés en termes d'allèles. Les allèles sont généralement codominants et donc, chacun d'entre eux s'exprime chez les hétérozygotes, donnant des profils électrophorétiques typiques. Les alloenzymes subissant une ségrégation mendélienne au sein des populations, cette interprétation est intéressante car les phénotypes peuvent alors être traduits en termes de génotypes, gènes et allèles. Si le nombre de systèmes enzymatiques analysés est suffisant, on considère que les gènes étudiés constituent un échantillon aléatoire représentatif de la variabilité génétique de l'organisme étudié.

Pasteur et al. (16) estiment que l'électrophorèse détecte environ un tiers des remplacements d'acides aminés. En effet, pour être visible à l'électrophorèse, la mutation doit entraîner le remplacement d'un acide aminé par un autre de charge différente, et ces différences de charge doivent pouvoir se détecter dans les conditions expérimentales retenues.

3.1.2. Matériel biologique :

Les stocks de *Leishmania* proviennent de divers centres donneurs : Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold (Anvers, Belgique), mission ORSTOM de Quito (Equateur), Yale Arbovirus Research Unit (USA). Les stocks reçus de l'IMT d'Anvers étaient des culots parasitaires prêts à l'analyse, et déjà étudiés dans cet institut pour leur polymorphisme caryotypique. Les autres stocks ont été cultivés dans notre laboratoire.

Notre étude porte sur des stocks d'Equateur et du Pérou. Ces stocks ont été isolés soit de l'homme, soit du chien, soit du vecteur (l'espèce *Lutzomyia trapidoi* en Equateur), soit de pousseux. Les tableaux 1 et 2 donnent, quand ces informations sont disponibles, la date, l'origine géographique de l'isolat et l'hôte. Une série de souches de référence a été ajoutée à l'échantillonnage pour permettre des comparaisons.

Tableau 1

Origine des stocks de *Leishmania* du Pérou :

Code OMS	ITMAP	Localisation Département/province/district	BGU
MHOM/PE/90/HB22	2329	Piura/Huancabamba/Huancabamba	1
MHOM/PE/90/HB31	2330	Piura/Huancabamba/Huancabamba	1
MHOM/PE/90/HB39	2316	Piura/Huancabamba/Sondorillo	1
MHOM/PE/90/HB44	2317	Piura/Huancabamba/Sondorillo	1
MHOM/PE/90/HB55	2318	Piura/Huancabamba/Sondorillo	1
MHOM/PE/90/HB56	2319	Piura/Huancabamba/Sondorillo	1
MHOM/PE/90/HB67	2320	Piura/Huancabamba/Sondorillo	1
MHOM/PE/90/HB83	2321	Piura/Huancabamba/Conchaque	1
MHOM/PE/90/HB86	2322	Piura/Huancabamba/Faique	1
MHOM/PE/89/LC900	2323	Piura/Huancabamba/Sondorillo	1
MHOM/PE/91/LC1446	2361	Chiclayo/Lambayeque/Salas	2
MHOM/PE/91/LC1447	2362	Chiclayo/Lambayeque/Salas	2
MHOM/PE/91/LC1448	2365	Chiclayo/Lambayeque/Salas	2
MHOM/PE/90/LC443	2298	Ancash/Bolognesi/Huyallacayan	3
MHOM/PE/88/LC292	2297	Ancash/Bolognesi/Huyallacayan	3
MHOM/PE/90/LC468	2299	Ancash/Bolognesi/Huyallacayan	3
MHOM/PE/90/LC447	2296	Ancash/Bolognesi/Raquia	3
MHOM/PE/84/LH115	2294	Ancash/Recuay/Pararin	3
MHOM/PE/84/LC26	2125	Ancash/Bolognesi/Huyallacayan	3
MHOM/PE/84/LH78	2129 clone	Ancash	4
MHOM/PE/89/LH691	2331	Lima/Canta/Canta	4
MHOM/PE/89/LH696	2345	Lima/Huaral/Sunvilca	4
MHOM/PE/89/LH760	2326	Lima/Canta/ Atavillosbajo	4
MHOM/PE/90/LH827	2312	Lima/Canta/Lampiane	4
--/PE/--/LC1015	2348	Andes Pérou	4
MHOM/PE/85/LC106	2127 clone	Ancash/Santa Eulalia	4
MHOM/PE/76/SL5	2109	Ancash/Santa Eulalia	4
MHOM/PE/90/LCA01	2314	Ayacucho/Lucanas/Sancos	5
MHOM/PE/90/LCA04	2315	Ayacucho/Lucanas/Sancos	5
MHOM/PE/90/LCA08	2306	Ayacucho/Lucanas/Sancos	5
MHOM/PE/90/LCA09	2346	Ayacucho/Lucanas/Sancos	5
MHOM/PE/90/LCA11	2310	Ayacucho/Lucanas/Sancos	5
MHOM/PE/90/LH249	2307	Ayacucho/Lucanas/Jacsallo	5
IAYA/PE/90/La36	2337	Ayacucho/Lucanas/Sancos	5

- Tous ces stocks nous ont été fournis par l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold d'Anvers. Le code ITMAP est le code des stocks de cet Institut.
- BGU = représente le découpage de la région Andine du Pérou en unités biogéographiques du Nord au Sud (BGU 1 correspond à l extrême nord et BGU 5 correspond au sud) selon Lamas (29).
- L'étude en électrophorèse d'isoenzymes de ces stocks a été faite par Guerrini (6), sauf pour les souches suivantes : LH691; LH827; LH696 et LH 760.

Tableau 2
Stocks de *Leishmania* isolés en Equateur

Code OMS	Hôte	Localisation	Date d'isolation
MHOM/EC/92/E102*	Homme	Zumba (Pucapamba)	16/04/92
MHOM/EC/92/E107*	Homme	Zumba (Pucapamba)	16/04/92
MHOM/EC/92/Z9	Homme	Zumba	17/07/92
MHOM/EC/92/P5	Homme	Palanda	23/06/94
MHOM/EC/92/Z5	Homme	Zumba	17/07/92
MHOM/EC/92/E79	Homme	Vozandes (Quito)	10/02/92
MCHO/EC/92/PL21*	Paresseux	La Tablada	27/11/91
MCHO/EC/92/PL2*	Paresseux	La Tablada	21/02/92
MCAN/EC/92/DOG1*	Chien	Puerto Quito	09/01/92
ITRA/EC/92/EK112*	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	La Tablada	10/10/91
ITRA/EC/92/EK665	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	La Tablada	11/08/92
ITRA/EC/92/EK747	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	La Tablada	17/08/92
ITRA/EC/92/EK649	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	La Tablada	11/08/92
MHOM/EC/91/E67	Homme	Zumba (Palanda)	20/01/92
MHOM/EC/92/A8044*	Homme	La Tablada	04/08/92
MHOM/EC/91/E18*	Homme	La Tablada	26/11/91
MHOM/EC/91/E3*	Homme	La Tablada	24/11/91
MHOM/EC/91/E4*	Homme	La Tablada	24/11/91
MHOM/EC/91/E6*	Homme	Tazone	25/11/91
MHOM/EC/-/E73*	Homme		
MHOM/EC/92/E94	Homme	Santo Domingo	28/02/92
MHOM/EC/92/EK91*	Homme	Santo Domingo	28/09/91
MHOM/EC/91/E14*	Homme	La Tablada (Crisanto)	26/11/91
MHOM/EC/91/E19*	Homme	La Tablada	26/11/91
MHOM/EC/91/E29*	Homme	Santo Domingo	30/11/91
MHOM/EC/91/E30*	Homme	P.V.Maldona	30/11/91
MHOM/EC/92/E10	Homme	La Tablada (Cacao)	25/11/91
MHOM/EC/92/PR1	Homme		28/08/92
MHOM/EC/91/E12*	Homme	La Tablada (Crisanto)	25/11/91
MHOM/EC/92/E72	Homme	Santo Domingo	01/02/92
MHOM/EC/91/E11	Homme	La Tablada (Cacao)	25/11/91
IHAR/CO/86/LC500°		Colombie	1986
MCHO/EC/82/LSP1°		Equateur	1982
MHOM/BO/84/Lpz595°		Bolivie	1984
MCHO/PA/--/755°		Panama	

- * Stocks étudiés par Guerrini en électrophorèse d'isoenzymes (6).

- ° Les quatre dernières souches du tableau sont des souches de référence qui nous été fournies soit par l'institut de Médecine Tropicale d'Anvers, soit par Yale Arbovirus Research Unit.
LC 500 appartient à l'espèce *Leishmania colombiensis*, LSP1 appartient à l'espèce *Leishmania equatorensis*, Lpz595 à l'espèce *Leishmania braziliensis*, 755 à l'espèce *Leishmania panamensis*.

- Toutes les souches d'Equateur ont été isolées par Le Pont (mission ORSTOM de Quito)

Notre échantillonnage comprend certaines souches du Pérou et d'Equateur déjà caractérisées en isoenzymes par Guerrini (6).

3.1.3. Technique électrophorétique :

Toutes les procédures de migration ont été adaptées à partir des protocoles décrits par Harris et Hopkinson (17), Richardson, Baverstock et Adams (18), Lanham et al. (19) et Tibayrenc et al. (20). Ces techniques sont résumées dans Ben Abderrazak et al. (21).

- Préparation des extraits enzymatiques :

A partir de culots parasitaires congelés et conservés à -70°C , les leishmanies sont lysées avec une solution hypotonique stabilisatrice d'enzymes composée de : DTT 2 mM, Acide Amino-caproic 2 mM, EDTA 2 mM. Après une période de 20 mn dans la glace, le lysat est centrifugé à 5000 g pendant 15 mn, puis, le surnageant est prélevé et aliquoté. Il constitue l'extrait enzymatique et sera conservé à -70°C . Le culot cellulaire, lui, sera utilisé pour l'extraction de l'ADN total.

- Les systèmes enzymatiques étudiés :

Ce sont des enzymes classiques du métabolisme. Nous avons étudié quinze systèmes enzymatiques (voir Annexe 1) :

ACON, ALAT, GOT, G6PD, GPI, IDH, MDH, ME, MPI, NH, PEP, 6PGD, PGM. Ces systèmes permettent l'étude de 17 loci, en effet la NH1 et la ME permettent la détermination de deux loci. On les notera *Nh1-a* (pour le locus le plus rapide du système NH1) et *Nh1-b* (pour le locus le plus lent), *Me-1* (pour le locus le plus rapide du système ME) et *Me-2* (pour le locus le plus lent).

- Le support :

Les extraits enzymatiques sont déposés sur des plaques d'acétate de cellulose.

Les enzymes migrent dans le film de tampon à la surface du gel. L'acétate de cellulose présente plusieurs avantages. En effet, les gels sont commercialisés prêt à l'emploi. La quantité d'extraits enzymatiques déposée est très faible. La migration est rapide, elle dure tout au plus 30 mn. Le matériel d'électrophorèse provient des laboratoires HELENA (Beaumont, Texas, USA). Les réactifs chimiques proviennent des laboratoires SIGMA (USA).

- La migration :

La cuve comprend deux compartiments externes qui sont remplis avec un tampon d'électrophorèse. C'est avec ce même tampon pur ou dilué que les plaques d'électrophorèse sont imbibées pendant 20 mn avant migration. Douze échantillons sont alors déposés sur les gels à l'aide d'un applicateur spécial. Suivant le système enzymatique étudié, on réalise 1, 2, 3 ou 5 applications.

Les plaques préparées sont disposées dans les cuves à électrophorèse, face plastifiée vers le haut. Le contact avec le tampon contenu dans les compartiments externes est assuré par des bandelettes

de papier filtre. Les compartiments internes de la cuve reçoivent des éponges réfrigérantes, placées préalablement au congélateur à -20°C. Le voltage et le temps de migration dépendent du système enzymatique étudié (Annexe 1).

- La révélation :

Après migration, les bandes protéiques sont révélées par des procédés histochimiques spécifiques. Cette révélation s'effectue sur un milieu solide constitué d'agarose à 1,2 % mêlé à une quantité égale d'une solution de coloration spécifique de l'enzyme à révéler (Annexe 2). En fin de migration, la plaque d'électrophorèse est déposée sur le gel d'agarose, face plastifiée vers le haut, et placée dans une étuve à 37°C. La révélation est arrêtée en plongeant la plaque dans un bain d'acide acétique à 5%. Après lavage dans l'eau, la plaque est séchée sur du papier absorbant.

3.1.4. Interprétation des résultats :

Les zymogrammes sont lus locus par locus. Cette lecture est interprétée en terme de génétique des populations. Nous avons tenté dans la mesure du possible d'associer à chaque phénotype observé un génotype allélique. Mais il s'avère que pour la plupart des loci, cette interprétation était impossible. Nous avons donc effectué dans ce cas une lecture génotypique non allélique.

Chaque stock est caractérisé par un ensemble de génotypes unilocus. Tous les stocks apparaissant identiques entre eux pour les systèmes enzymatiques utilisés sont rangés dans un même zymodème (22). Le degré de parenté génétique entre deux zymodèmes donnés est estimé par leur pourcentage de bandes communes.

Les électromorphes sont répertoriés d'après leur vitesse de migration. La bande la plus rapide est notée 1, la 2^e plus rapide est notée 2, et ainsi de suite. Notre étude utilisant des résultats isoenzymatiques de Guerrini, certaines souches déjà caractérisées ont été incluses dans chaque manipulation pour permettre la classification des nouvelles souches dans le même cadre de lecture. Pour un petit nombre de stocks, la révélation de certains systèmes enzymatiques a été impossible. Nous avons considéré ces systèmes comme des données manquantes, elles ont été notées 99 dans le tableau des génotypes (Annexe 3).

3.2. RAPD

3.2.1. Généralités :

Les marqueurs génétiques moléculaires se sont révélés être un excellent outil d'analyse de la variabilité génétique, et des liens de parenté génétique. Le développement depuis deux ans de la technique d'amplification par des amorces aléatoires, ou RAPD, montre le potentiel important de cette méthode (23; 24).

Cette technique permet un sondage plus large du génome que la technique d'isoenzymes, et donc une représentation plus grande de la variabilité génomique au sein d'une population.

Le principe de cette technique repose sur l'amplification d'ADN avec des primers de 10 nucléotides dont la séquence est arbitrairement sélectionnée. Les primers s'apparient à leurs séquences

complémentaires dans l'ADN dénaturé et la *Taq* polymérase synthétise le brin d'ADN à partir de l'extrémité 3' de ces primers. Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,6%. La présence ou non de fragments amplifiés dépend de l'existence dans le génome étudié de séquences complémentaires au primer et le profil d'amplification dépend du primer utilisé, mais aussi des conditions de réaction. Dans l'état actuel des connaissances, ces bandes ne peuvent être interprétées en terme d'allèles. Un profil définit un génotype non allélique. Les 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 qui est hétérozygote ou homozygote (25). Un primer donné amplifie un locus donné, ou un groupe de loci donnés. On part du principe qu'un autre primer, pour un ADN donné, amplifiera un autre locus, ou d'autres loci (McClelland, communication personnelle).

Les RAPD sont susceptibles de détecter le polymorphisme engendré par divers événements mutationnels comme: le changement d'un nucléotide dans la séquence d'appariement de l'amorce, une délétion ou une insertion dans le site d'appariement, une délétion ou une insertion qui provoque un changement de taille du segment d'ADN amplifié (25). 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 par Tibayrenc et al. (24) pour l'identification génétique des souches de *Trypanosoma* et *Leishmania*.

3.2.2. Matériel biologique :

Les stocks du Pérou analysés par RAPD sont les mêmes que ceux qui ont été analysés par isoenzymes (voir Tableau 1). Ceux d'Equateur concernent uniquement les hybrides putatifs déjà identifiés par Guerrini (6) par analyse isoenzymatique, et les deux souches de référence *L. panamensis* et *L. braziliensis*, qui constituent les "parents" présumés de ces hybrides : E102; Z9; P5; Z5 (voir Tableau 2).

3.2.3. Extraction d'ADN :

L'ADN est purifié à partir des culots obtenus après l'extraction enzymatique.

La préparation de l'ADN génomique comporte trois étapes.

- Lyse des cellules et digestion :

Le culot parasite est repris dans un volume de 400 μ l de tampon de lyse (TE pH 8 = Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) auquel est rajouté du SDS (sodium dodécyl sulfate) à 1% final. La solution est incubée à 55 °C pendant une nuit en présence de 2 mg/ml de protéinase K.

- Déprotéinisation :

Les protéines sont éliminées par des extractions successives, de volume à volume, au phénol (deux fois) et au chloroforme, alcool isoamylique (deux fois). Le phénol dénature et dissout les protéines. Le chloroforme dénature les lipides, et permet d'éliminer les traces de phénol. Après chaque extraction, la solution bien homogénéisée est centrifugée à 12000 g pendant 5 mn à 4°C.

La phase aqueuse contient l'ADN, la phase organique inférieure est jetée.

- Précipitation de l'ADN :

L'ADN extrait est précipité par l'acétate de sodium 3M à 1/10 du volume et 2,5 volume d'éthanol absolu froid, pendant une heure à -70°C. On centrifuge la solution à 12000 g pendant 15 mn à froid. L'ADN est obtenu sous forme de culot. Trois lavages successifs à l'éthanol absolu froid à 70% permettent l'élimination des sels et du SDS. Le culot lavé est séché puis resuspendu dans un volume minimum d'eau stérile.

- Dosage spectrophotométrique :

La mesure de l'absorbance de l'ADN extrait permet de calculer sa concentration et de vérifier sa pureté.

On établit le spectre d'absorption de la solution d'ADN à des longueurs d'ondes variant de 210 nm à 300 nm (UV). La contamination par l'ARN ou les protéines montre une distorsion de la courbe. Pour un ADN purifié, on obtient un pic d'absorption maximum autour de 257 nm. La concentration est calculée à partir de la densité optique (DO) au maximum d'absorption : 1 unité de DO représente une concentration de 50 µg/ml d'ADN en double brin. L'ADN en solution est conservé dans de l'eau stérile à -20°C.

3.2.4. La technique RAPD :

Les conditions techniques que nous avons utilisées sont analogues à celles de Williams et al. (26).

3.2.4.1. Réactifs et matériel :

La *Taq* polymérase est fournie par Boehringer Mannheim. Le tampon de réaction est le suivant :

Tris-HCl 100 mM pH 8.3; MgCl₂(6H₂O) 15 mM;

KCl 500 mM; gélatine 1 mg/ml.

Les primers d'oligonucléotides sont constituées de 10 nucléotides, et ne contiennent aucun palindrome. Les amorces choisies ont été testées par Tibayrenc et al. (24). Dans notre étude, nous utilisons six amorces différentes (Biotrope) : A1, A4, A5, A7, A10, A15.

- Appareil :

Les amplifications ont été réalisées sur un cycleur automatique (modèle PHC-3). Le programme d'amplification est : 45 cycles comportant trois segments :

- dénaturation (1 mn; 94°C)

- appariement (1 mn; 36°C)

- synthèse (2 mn; 72°C)

1 cycle d'élongation finale de 7mn à 72°C.

3.2.4.2. Amplification et visualisation des bandes :

- Amplification :

Il est préférable de travailler dans les conditions les plus stériles possibles. En effet, une seule molécule d'ADN contaminante peut être amplifiée et serait susceptible d'interférer avec nos résultats. Pour vérifier la spécificité des bandes, chaque amplification sera réalisée avec un témoin négatif (sans ADN, mais avec tous les produits nécessaires à l'amplification). En fait, l'expérience montre que des contaminations légères ne sont pas préoccupantes, car si l'ADN "polluant" est en très petite quantité par rapport à l'ADN spécifique du parasite, c'est ce dernier seul qui apparaîtra sur les gels (McClelland, communication personnelle).

La réaction est effectuée dans 100 μl de milieu de réaction :

- 1- 10 μl de tampon spécifique de *Taq* polymérase,
- 2- 2 μl de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (à 5mM)
- 3- 2 μl de primer (à 10 μM)
- 4- 2 μl d'ADN (10 ng/ μl)
- 5- 0,5 μl de *Taq* polymérase (2,5 UI)
- 6- eau stérile qsp 100 μl

150 μl de paraffine sont distribués dans chaque tube pour empêcher l'évaporation durant l'amplification.

Les échantillons préparés sont placés dans le cycleur automatique. Le programme d'amplification dure environ six heures.

- Gel d'électrophorèse :

Les fragments d'ADN amplifiés sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur un gel à 1,6% d'agarose contenant 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium. La migration est faite à 50 volts pour les minigels (40 ml) et 120 volts pour les grands gels (350 ml). Le gel est ensuite observé sous UV.

- Lecture des profils RAPD :

Les bandes seront codées par un nombre, commençant par 1 pour la plus lente (donc le fragment d'ADN le plus lourd). Pour chaque primer, chaque stock est donc représenté par un ensemble de nombres.

Chaque stock sera caractérisé par un ensemble de profils correspondant aux différents primers utilisés. Tous les stocks apparaissant identiques pour les 6 primers sont rangés dans un même "RAPDème" (terme forgé par analogie avec "zymodème"). Comme pour les isoenzymes, les degrés de parenté génique entre deux RAPDèmes donnés seront estimés par le pourcentage de bandes communes qu'ils montrent.

Bien qu'un primer donné soit susceptible d'amplifier plusieurs loci pour un échantillon donné, et que les loci amplifiés ne soient pas forcément les mêmes entre deux stocks différents pour un primer donné, d'un point de vue statistique, les génotypes révélés par un primer donné ont été

traités comme "génotypes unilocus", et l'ensemble des génotypes révélés pour les 6 primers, comme des "génotypes multilocus". En effet, pour les tests de déséquilibre de liaison que nous employons, ce traitement statistique est licite (24), car les chances que deux primers différents amplifient les mêmes loci sont négligeables.

3.3. Les méthodes d'analyse des résultats :

Le degré de ploïdie des *Leishmania* reste hypothétique. Par ailleurs, chez les *Leishmania*, une interprétation allélique des gels est souvent mal aisée dans le cas des isoenzymes, et actuellement impossible dans le cas des RAPD. Nous avons donc conduit des analyses permettant de s'affranchir totalement de toute inférence sur la ploïdie des organismes étudiés, et sur la composition allélique des génotypes observés.

3.3.1. Distance phénétique ou Distance de Jaccard (27) :

Elle permet de quantifier la dissemblance phénétique entre zymodèmes, ou entre RAPDèmes (par ce néologisme, nous désignons ici une collection d'isolats apparaissant identiques quant à leurs profils RAPD). Les relations entre les stocks sont calculées par le pourcentage de bandes communes sur le nombre total de bandes observées:

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

- C étant le nombre de bandes communes aux deux zymodèmes ou RAPDèmes, et N, le nombre total de bandes révélées pour les deux zymodèmes ou RAPDèmes.

Ces distances ont été calculées au moyen du programme informatique TAXONOMIE (28).

3.3.2. Dendrogramme :

Le dendrogramme est construit à partir de la matrice de distances de Jaccard par une classification hiérarchique ascendante. Celle-ci a pour but d'inclure chaque stock étudié dans un groupe, puis de lier et de hiérarchiser les groupes (28).

Le dendrogramme permet de visualiser les relations taxonomiques entre les différents zymodèmes ou rapdèmes, car il met en évidence les dissemblances ou les ressemblances.

La construction du dendrogramme a aussi été réalisée à l'aide du programme informatique TAXONOMIE (28).

3.3.3. Analyse du mode de reproduction du parasite :

Les deux conséquences fondamentales d'une reproduction sexuée sont la ségrégation des allèles à des loci donnés, et la recombinaison des génotypes d'un locus à l'autre. Les critères de clonalité proposés par Tibayrenc, Kjellberg & Ayala (2) sont relatifs d'une part à l'absence de ségrégation et d'autres part à l'absence de recombinaison. Certains critères peuvent être analysés qualitativement,

d'autres requièrent des tests statistiques.

Les tests statistiques sont de deux types : les tests de ségrégation et les tests de recombinaison. Dans notre étude nous utiliserons seulement les tests de recombinaison. En effet les tests de ségrégation supposent une interprétation allélique des génotypes et une structure diploïde du génome étudié : l'utilisation de ces tests est donc difficile ou impossible dans le cas de nos données (voir plus haut). Par contre, les tests de recombinaison sont utilisables indépendamment de toute connaissance sur la ploïdie, et de la composition allélique des génotypes .

Pour tous ces tests, l'hypothèse nulle est une situation totalement panmictique. Des résultats statistiquement significatifs permettent seulement de rejeter cette hypothèse nulle : il ne s'agit pas de tests de clonalité, mais d'écarts à la panmixie.

Ces tests sont réalisés à partir d'un programme informatique TURBO- PASCAL (2).

- Les tests de recombinaison :

Dans une population panmictique, la fréquence théorique d'un génotype multilocus est égale au produit des fréquences observées des génotypes unilocus qui le constituent.

- Le test d1:

Il calcule la probabilité d'obtenir, par simple hasard, dans une population panmictique, un génotype multilocus donné avec un effectif égal ou supérieur à celui qui est effectivement observé dans l'échantillon étudié. Cette probabilité P , estimée par analyse combinatoire, 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.

Il est à remarquer que le même résultat peut être obtenu par un simple X^2 . Mais dans la plupart des cas, les effectifs théoriques sont très petits, ce qui rend le X^2 inapplicable.

Les tests suivants reposent sur des simulations de Monte Carlo, avec 10000 simulations pour chaque test.

- Le test d2 :

Il calcule à partir des fréquences des génotypes unilocus observés, la probabilité d'obtenir un génotype multilocus quelconque avec un effectif égal ou supérieur à celui du génotype multilocus le plus représenté dans l'échantillon étudié.

- Le test e :

Il calcule la probabilité d'obtenir un nombre de génotypes multilocus différents inférieur ou égal à celui qui est effectivement observé dans l'échantillon étudié.

- Le test f :

Il calcule la probabilité d'observer un niveau de déséquilibre de liaison égal ou supérieur à celui qui est effectivement observé dans l'échantillon.

Tous ces tests explorent différentes facettes d'un même phénomène biologique, le déséquilibre de liaison, ou association non aléatoire de génotypes d'un locus à l'autre. Ils ne sont pas redondants, mais complémentaires, et apportent chacun une information spécifique. Le test f est le plus "global". Les autres explorent différents aspects qualitatifs du déséquilibre de liaison (sur- ou sous- représentation de certains génotypes).

IV Résultats :

4.1. Les stocks du Pérou :

4.1.1. Résultats isoenzymatiques :

4.1.1.1. Lecture et interprétation des zymogrammes :

Nous avons étudié 17 loci polymorphes.

Nous avons tenté d'interpréter les phénotypes observés en terme de génotypes et d'allèles. Les seuls loci dont la lecture allélique est possible sont : *Acon*, *Nh1-a*, *Nh1-b*, *Me1* et *Pgm*. En effet, les zymogrammes correspondants donnent, soit une seule bande reproductible (interprétée comme un état homozygote), soit des profils hétérozygotes typiques reproductibles. Tous les autres loci présentent des profils complexes, plusieurs bandes reproductibles ne correspondant pas à des aspects hétérozygotes typiques.

4.1.1.2. les zymodèmes : (Annexe 3)

L'étude de 34 stocks de *Leishmania* a permis d'individualiser 13 zymodèmes différents. Le zymodème 1 est représenté 9 fois, le 4 est représenté 11 fois, le 7, 2 fois, le 3, 3 fois et les autres, 1 seul fois. La constitution génotypique des zymodèmes, ainsi que l'origine géographique des différents stocks, sont données dans l'Annexe 4. Comme l'a fait G. Lamas (29), nous découperons les régions du Pérou étudiées (région andine du nord au sud) en cinq zones biogéographiques (Tableau 1). On observe une certaine variabilité génotypique d'une région à l'autre. Pour les unités biogéographiques 1 et 5, un seul zymodème est représenté dans chacune d'elle : le zymodème 1 pour l'unité biogéographique 1 (seul le stock HB 67 a un génotype différent), et le zymodème 4 pour l'unité biogéographique 5. Le zymodème 4 est rencontré dans deux unités biogéographiques différentes : 3 et 5. Dans l'unité biogéographique 3, on trouve principalement le zymodème 4, et un stock LC 447 avec un zymodème différent (z 5). Dans l'unité biogéographique 4 on observe une grande variabilité de zymodème, (zymodème 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). Le zymodème 3 ne se rencontre que dans l'unité biogéographique 2. Il est composé de seulement trois stocks (LC 1446, LC 1447, LC 1448), caractérisés par Guerrini (6) comme appartenant à l'espèce *Leishmania guyanensis*.

Donc, par la seule observation de la répartition des génotypes multilocus, nous observons une certaine structuration géographique. Dans ces stocks péruviens, on n'observe aucun profil typique d'hétérozygotie.

4.1.1.3. Tests de génétique des populations :

Bien que les "espèces" de *Leishmania* soient définies indépendamment du critère mixiologique, et ne puissent être considérées comme des unités potentiellement panmictiques, nous avons effectué les tests séparément pour chaque espèce. Dans l'échantillonnage péruvien, ceci exclut 4 stocks, à savoir LC 1446, LC 1447, LC 1448 et LH 691, considérés comme appartenant à l'espèce

Leishmania guyanensis (6).

Par ailleurs, ces tests doivent être utilisés dans la mesure du possible dans des conditions proches de la sympatrie.

Ces deux conditions sont difficiles à concilier ici. En effet, en considérant les espèces prises séparément, on diminue considérablement le polymorphisme isoenzymatique, ce qui diminue d'autant la puissance des tests : plus on se rapproche du monomorphisme, moins on a de chances de dépister des écarts à la panmixie (cet inconvénient est moindre dans le cas des données RAPD, qui montrent une variabilité génétique considérable, même au sein de chaque espèce). D'autre part, bien sûr, en essayant d'obtenir des conditions de sympatrie satisfaisante, on diminue d'autant le nombre d'individus, et partant, la puissance des tests.

Tout ceci conduit à considérer le présent échantillon comme fort peu satisfaisant pour une analyse rigoureuse de génétique des populations. Les résultats statistiques, qu'ils soient positifs ou négatifs, seront à interpréter avec prudence. En fait, les conclusions du présent travail sont beaucoup plus basées sur une analyse qualitative des profils observés que sur ces résultats statistiques sujets à caution. Un échantillonnage de stocks spécialement conçu au départ pour l'analyse de génétique des populations est actuellement en cours d'étude dans le cadre d'un projet communautaire, en collaboration avec des équipes belges et sud-américaines.

Les échantillons étudiés ont été prélevés uniquement dans la région andine du Pérou, cela limite dans une certaine mesure le biaisage dû à une structuration géographique. Nous n'avons pas pu appliquer ces tests par unités biogéographiques car l'échantillonnage est trop petit, et dans certains cas les génotypes multilocus sont monomorphes ou presque (exemple de l'unité biogéographique 1).

Les résultats des différents tests d1, d2 et e, sont non significatifs. Le test f est faiblement significatif ($p = 0,025$). Cependant, ceci est supérieur à la limite de signification (0,01) retenue par Tibayrenc et al. (30) pour ce test.

- Génotypes ubiquistes :

Certains zymodèmes ont été isolés à de très grandes distances, et sur des périodes de temps couvrant de nombreuses années. Par exemple le stock LH 115 a été isolé en 1984 dans l'unité biogéographique 3, et le stock LCA 01, appartenant au même zymodème, a été isolé en 1990 dans l'unité biogéographique 5. L'ubiquité de ces génotypes peut évoquer une propagation clonale, bien que cette hypothèse demande à être vérifiée à la faveur d'échantillonnages mieux adaptés.

4.1.1.4. Etudes des relations phénétiques : dendrogramme (Figure 1 - A : 21) :

Le dendrogramme construit à partir de la matrice de distances de Jaccard montre deux rameaux clairement détachés l'un de l'autre, qui semblent correspondre respectivement aux espèces *Leishmania peruviana* et *Leishmania guyanensis*. Ce dernier rameau comprend les 4 stocks suivants : LC 1446, LC1447, LC1448, et LH 691. Ces résultats recourent ceux de Guerrini (6). On remarque que les deux zymodèmes les plus représentés z1 et z4 sont phénétiquement très proches l'un de l'autre, et ont pourtant été échantillonnés dans deux unités biogéographiques très

éloignées (1 et 5). On note que sur toute la région andine, l'espèce *L. peruviana* est assez homogène dans notre échantillon.

4.1.2. Résultats de l'analyse RAPD pour les échantillons du Pérou :

4.1.2.1 Lecture des profils RAPD :

Nous avons analysé les résultats obtenus avec six primers différents. La lecture ne pouvant être allélique, pour un primer donné, chaque profil distinct et reproductible est assimilé à un génotype non allélique. Le nombre de loci révélé pour chaque primer est inconnu. On part du principe que les loci révélés pour un primer donné sont distincts de ceux qui sont révélés par un autre primer (McClelland, communication personnelle).

Nous avons vérifié que les profils obtenus sont reproductibles. Pour l'analyse de génétique des populations, nous utiliserons, comme pour les isoenzymes, des tests indépendants du degré de ploïdie, et ne demandant pas une interprétation allélique des génotypes.

4.1.2.2. Les RAPDèmes :

Par l'analyse RAPD, une collection de stocks donnée montre un plus grand polymorphisme génotypique que la méthode isoenzymatique. On observe 28 RAPDèmes différents, l'un d'eux comprenant 3 stocks (Annexe 4). Dans chaque unité biogéographique, les RAPDèmes sont plus ou moins variables. Pour l'unité biogéographique 4, on remarque une grande variabilité de RAPDèmes. Pour les autres, à l'intérieur d'une unité biogéographique, les RAPDèmes sont plus ou moins similaires entre eux.

4.1.2.3. Les tests de génétique des populations :

Nous avons réalisé ces tests de la même manière que pour les données obtenues par les isoenzymes. L'échantillon étudié est donc aussi de 30 stocks et de 24 RAPDèmes différents.

- Les Tests d1, d2 et e :

Ces tests sont significatifs. En effet, la probabilité d'observer le RAPDème dominant (3 stocks) avec un effectif égal ou supérieur à celui qu'on observe effectivement est seulement de $3,6 \times 10^{-17}$ (test d1). Le test d2 donne une probabilité de 0,056 (à la limite de la signification) d'obtenir un RAPDème quelconque répété 3 fois sur un échantillon de 30 stocks. Le test e donne une probabilité de $2,1 \times 10^{-3}$ d'obtenir seulement 24 génotypes multilocus différents, ou moins.

- Test du déséquilibre de liaison :

Ce test est significatif, on observe un fort déséquilibre de liaison. La probabilité d'observer un tel niveau de déséquilibre dans une population panmictique est de 0.

- Les génotypes sur-représentés ubiquistes :

Par la technique RAPD, le nombre de génotypes répétés est moins important. On observe quand même des RAPDèmes identiques pour des stocks isolés à des périodes différentes : LC 292 a été

isolé en 1988 et LC 443 en 1990. La stabilité de certains génotypes dans le temps est en faveur d'une reproduction clonale.

L'analyse de génétique des populations montre clairement, pour les résultats RAPD, que ces populations ne sont pas à l'équilibre. Cependant, comme nous l'avons vu, d'autres explications qu'une reproduction uniparentale doivent être considérées (voir discussion).

4.1.2.4. Etudes des relations phénétiques : Dendrogramme (Figure 1 - B : 21)

Le dendrogramme construit avec les données RAPD rend plus hétérogène le groupe *Leishmania peruviana*. En effet, les distances phénétiques sont importantes. Au sein de ce groupe *Leishmania peruviana*, on observe deux rameaux majeurs assez homogènes. Le rameau 1 représente l'unité biogéographique 1, le rameau 2 réunit des RAPDèmes de plusieurs unités géographiques. Le taxon *guyanensis* est toujours bien individualisé.

4.1.3. Comparaison des résultats isoenzymatiques et RAPD pour les stocks du Pérou :

- Génotypes et unités biogéographiques :

La méthode RAPD révèle un polymorphisme plus important. Par exemple, le zymodème 1 répété 9 fois éclate en 7 RAPDèmes, et le zymodème 4 répété 11 fois éclate en 8 RAPDèmes. Mais les RAPDèmes correspondant à un même zymodème sont très apparentés les uns aux autres.

La variabilité au sein d'une unité biogéographique est donc plus importante, mais ceci n'est pas en contradiction avec les résultats des isoenzymes, nous pourrions l'observer en comparant les dendrogrammes.

Les génotypes correspondant au taxon *Leishmania guyanensis* sont très éloignés du groupe *Leishmania peruviana* aussi bien avec les isoenzymes qu'avec les RAPD.

- Les tests génétiques :

Ils ne sont pas significatifs pour les isoenzymes, mais ils le sont nettement par la méthode RAPD. Donc, seuls les RAPD nous permettent de rejeter l'hypothèse nulle. On l'explique aisément, car les RAPD mettent plus en évidence le polymorphisme génotypique. Dans le cas des isoenzymes, comme nous l'avons vu, la constitution de l'échantillonnage aboutit à une situation proche du monomorphisme, ce qui diminue fortement les chances d'observer des tests positifs.

- Les dendrogrammes :

Les deux dendrogrammes sont comparables en ce sens que les subdivisions principales sont les mêmes. Mais le dendrogramme RAPD montre une variabilité bien plus importante, et rend plus hétérogène le groupe *peruviana*. La séparation des deux taxons *Leishmania peruviana* et *Leishmania guyanensis* devient donc moins nette. La méthode RAPD permet donc de distinguer une variabilité additionnelle au sein des zymodèmes. Il est à noter que l'on n'a utilisé que 6 primers dans le présent travail. Or, le nombre de primers pouvant être employé est énorme (800 primers différents actuellement commercialisés par Operon technologies). Ceci rend le pouvoir de résolution de la méthode RAPD virtuellement illimité (Tibayrenc et al., 1993).

- Corrélation :

nous avons réalisé des tests de corrélation entre les données RAPD et isoenzymatiques.
Pour un degré de liberté de 560 :

- on obtient un coefficient de corrélation :

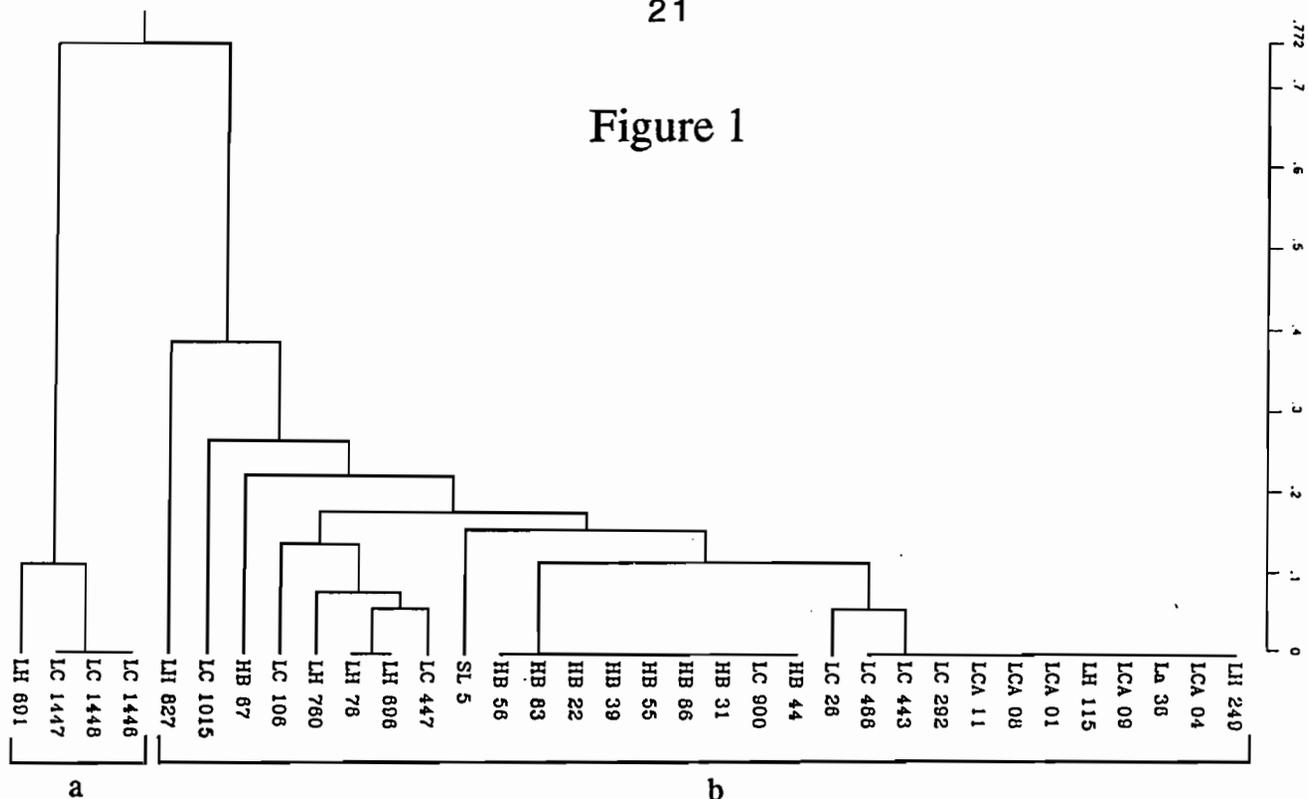
$$R = 0,194$$

- une probabilité que la corrélation soit due au hasard :

$$P = 10^{-4}$$

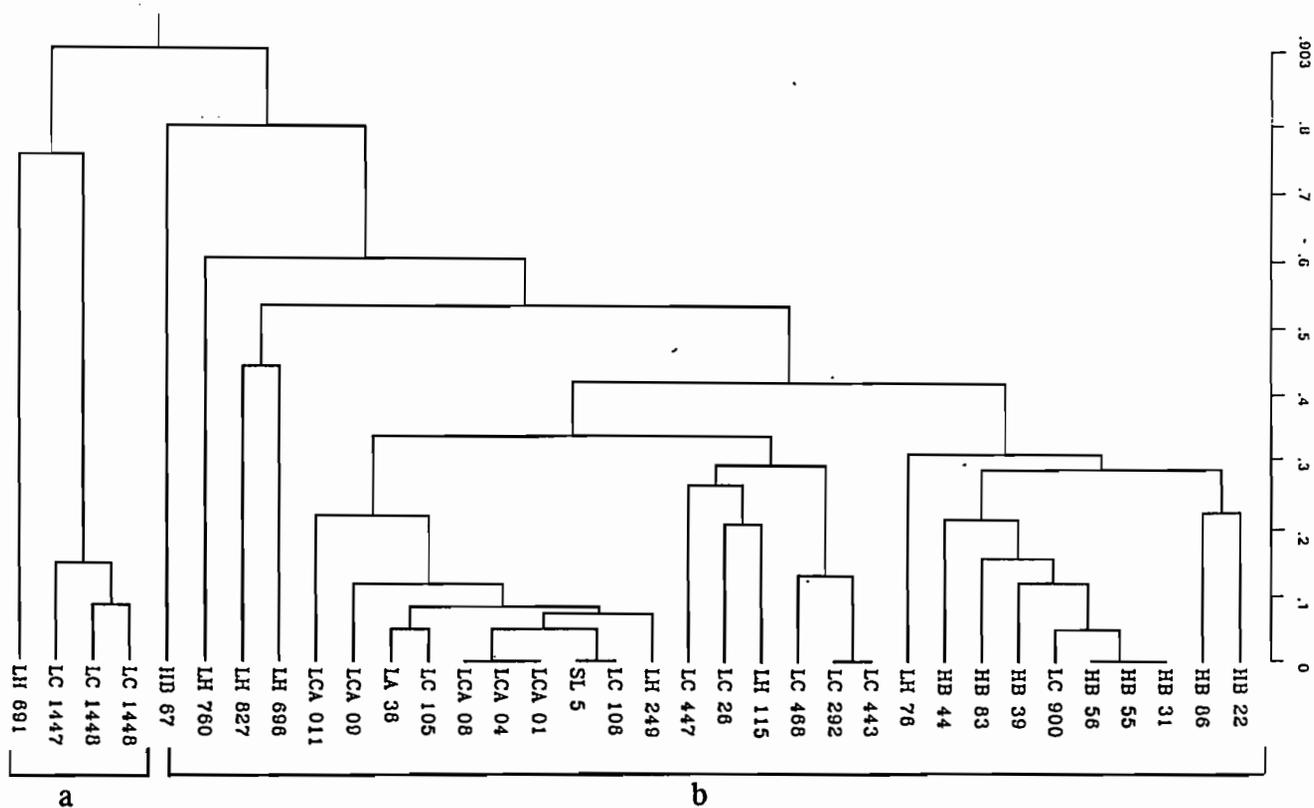
Il existe donc une corrélation qui n'est pas due au hasard.

Figure 1



A- Dendrogramme tracé selon la méthode ascendante hiérarchique utilisant la matrice des distances de Jaccard estimées à partir des données isoenzymatiques des stocks du Pérou.

- a = correspond à l'espèce *Leishmania guyanensis*.
- b = correspond à l'espèce *Leishmania peruviana*.



B- Dendrogramme tracé selon la méthode ascendante hiérarchique utilisant la matrice des distances de Jaccard estimées à partir des données RAPD des stocks du Pérou.

- a = correspond à l'espèce *Leishmania guyanensis*.
- b = correspond à l'espèce *Leishmania peruviana*.

4.2. Les stocks d'Equateur :

4.2.1. les isoenzymes :

4.2.1.2. Les zymogrammes :

Nous avons étudié 16 loci polymorphes, car le deuxième locus de l'enzyme malique n'est pas interprétable sur nos zymogrammes. Pour cinq stocks d'Equateur (P5, E102, E107, Z5, Z9), nous observons des profils hétérozygotes typiques pour 2 loci, la *Nhl-b* et la *Pgm*. Le locus *Nhl-b* donne un zymogramme à cinq bandes, caractéristique d'une enzyme tétramérique, hétérozygote entre deux niveaux homozygotes 1-6 (voir photo 1). Le locus *Pgm* montre un hétérozygote à deux bandes (6-10), caractéristique d'une enzyme monomérique.

Pour ces loci, nous pouvons faire une interprétation allélique, il en est de même pour les loci *Nhl-a* et *Me-1*. Pour tous les autres cette lecture est impossible. Comme pour le cas du Pérou, nous appliquerons donc seulement les tests ne demandant pas une interprétation allélique.

4.2.1.3. les zymodèmes :

L'étude de 35 stocks d'Equateur a permis d'individualiser 28 zymodèmes différents (voir Annexe 5). Le zymodème 1 est répété 4 fois, le zymodème 13 est répété 2 fois, le zymodème 18 est répété 3 fois. Dans ces zymodèmes, nous avons inclus des souches de référence préalablement caractérisées: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania equatorensis*, *Leishmania colombiensis*.

On observe une grande hétérogénéité des génotypes multilocus, contrairement aux stock du Pérou. Les zymodèmes présentant des loci hétérozygotes montrent des profils isoenzymatiques identiques soit à *Leishmania braziliensis*, soit à *Leishmania panamensis*. Mais ces stocks ont aussi des génotypes unilocus, différents des deux souches de référence : pour la G6PD, et la NH2.

4.2.1.3. Les tests de génétique des populations :

Comme pour le cas du Pérou, dans un but de cohérence, nous ne pratiquons pas ces tests en réunissant des espèces différentes. Seul le groupe *Leishmania panamensis* présente un effectif suffisant pour cela. En effet, sur les 35 stocks, 27 semblent se rattacher à cette espèce d'après l'aspect du dendrogramme (Figure 2) obtenu à partir des distances de Jaccard. Nous avons éliminé les souches de références (*L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. equatorensis*, *L. colombiensis*), deux souches E 72 et E 79 qui n'appartiennent manifestement pas à l'espèce *Leishmania panamensis* et les deux stocks isolés de paresseux : PL21 et PL22 caractérisés par Guerrini (6) comme *Leishmania equatorensis*. Nous travaillons donc avec 27 stocks individualisés en 22 zymodèmes différents. Le zymodème le plus représenté est répété 4 fois.

- Les tests d_1 , d_2 et e :

Ces tests sont significatifs, avec des niveaux de signification de :

$2,25 \times 10^{-4}$; $3,3 \times 10^{-3}$; et 5×10^{-4} , respectivement.

Photo 1: Zymogramme de la NH1 pour les stocks d'Equateur

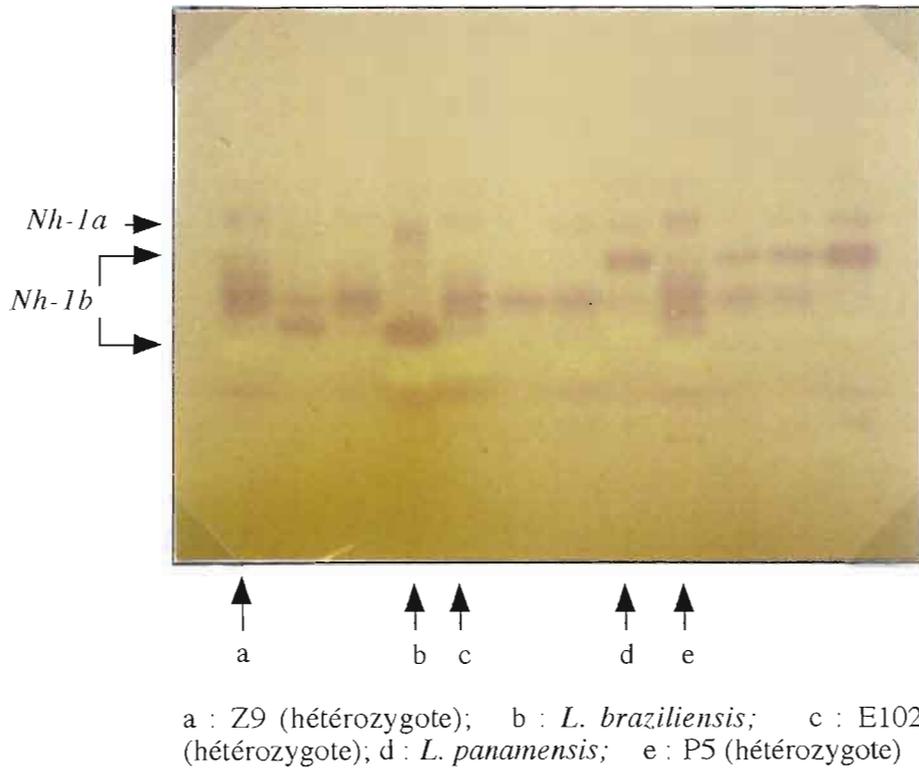
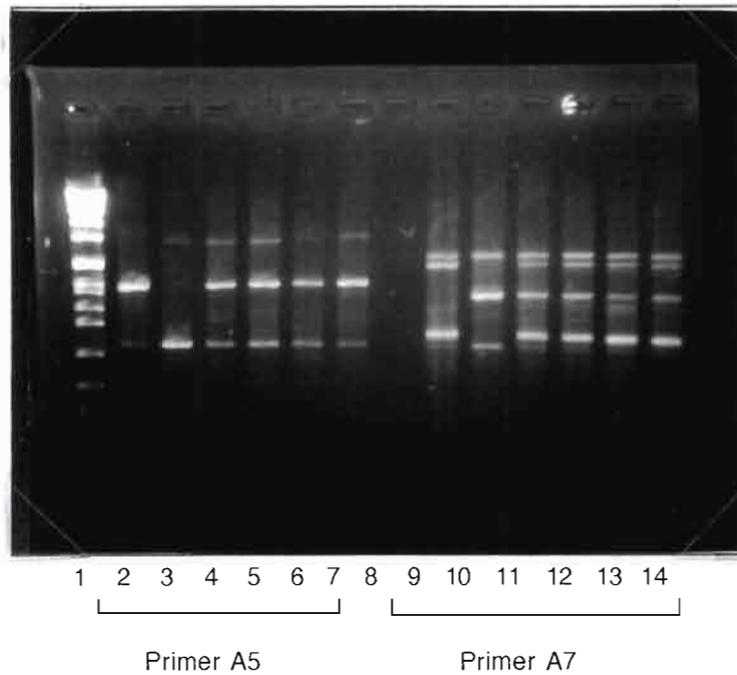


Photo 2 : Profil RAPD des Stocks hybrides d'Equateur



1 : marqueur de poids moléculaires; 2 et 9 : *L. panamensis* ;
 3 et 10 : *L. braziliensis*; 4 et 11: Z9; 5 et 12 : P5,
 6 et 13 : E102; 7 et 14 : Z5; 8 : témoin négatif

- Test f:

Le déséquilibre de liaison, trouvé dans notre échantillon, a une probabilité nulle d'être observé dans une population panmictique. Ce test est donc hautement significatif.

Des écarts très importants par rapport aux prédictions panmictiques sont donc relevés au sein de l'espèce *Leishmania panamensis* en Equateur.

- Génotypes sur-représentés ubiquistes :

Certains stocks à génotypes identiques ont été isolés à des périodes différentes. Par exemple, au sein du zymodème 1, E102 et P5 sont deux isolements pratiqués à quelques mois de distance. Ces génotypes paraissent avoir une certaine stabilité dans le temps. L'ubiquité de ces génotypes évoque une propagation clonale, bien que d'autres explications doivent être prises en compte (voir discussion).

4.2.1.4. Etude des relations phénétiques : dendrogramme (Figure 2)

Le dendrogramme montre un groupe *Leishmania panamensis* très hétérogène. Tous les stocks isolés de l'homme appartiennent au taxon *Leishmania panamensis*, ceci est en accord avec les données de Hashigushi et Gomez Landires (31), et recoupe les résultats de Guerrini (6). Ce dendrogramme ne regroupe pas du tout les stocks par hôte. Il sépare nettement ce groupe *Leishmania panamensis* du taxon *Leishmania braziliensis*.

Seuls les deux stocks E 72 et E 79, isolés de l'homme, n'appartiennent pas au groupe *Leishmania panamensis*. Ils présentent des caractères intermédiaires entre *Leishmania peruviana* et *Leishmania braziliensis*. Ils sont séparés de *Leishmania braziliensis* par une distance génétique assez élevée.

Les souches de référence *Leishmania colombiensis* et *Leishmania equatorensis*, et les stocks PL2 et PL21 isolés de paresseux sont bien individualisés par rapport aux autres espèces.

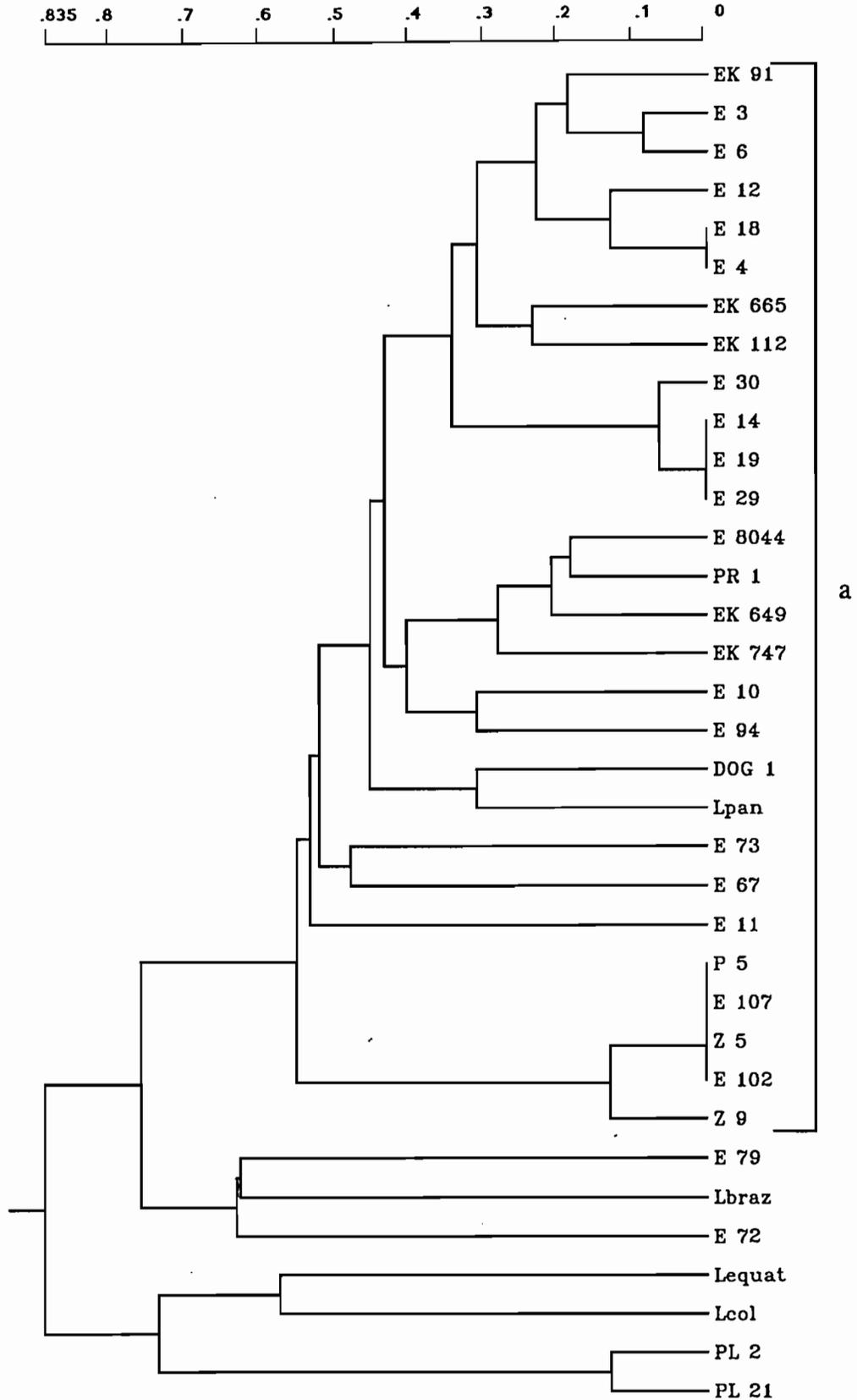
4.2.1.5. Les hybrides putatifs :

Les profils isoenzymatiques des stocks E102, E107, P5, Z5, Z9, suggèrent une hybridation entre deux espèces de leishmanies (voir photo 1) : *Leishmania panamensis* et *Leishmania braziliensis* (6). En effet, nous avons deux loci hétérozygotes dont les allèles correspondent à ceux que l'on observe à l'état homozygote chez ces deux espèces. Tous les génotypes observés aux autres loci sont une "image" soit de l'une, soit de l'autre. Seulement deux génotypes ne correspondent à aucune des deux espèces, les loci *Nh2* et *G6pd*.

Ces cinq stocks sont individualisés en 2 zymodèmes. Seul Z9 ne possède pas le même génotype, il diffère par une seule enzyme, la MDH.

Nous avons étudié ces hybrides putatifs par la méthode RAPD, pour voir si une étude de génétique moléculaire confirme ou infirme l'hypothèse d'hybridation entre *Leishmania panamensis* et *Leishmania braziliensis*.

Figure 2



Dendrogramme tracé selon la méthode ascendante hiérarchique utilisant la matrice des distances de Jaccard estimées à partir des données isoenzymatiques des stocks d'Equateur.
 - a correspond au groupe *Leishmania panamensis*.

4.2.2. Résultats de la méthode RAPD pour les souches hybrides : (voir Tableau 3)

Les stocks "parentaux" de *Leishmania braziliensis* et de *Leishmania panamensis* ont été sélectionnés sur la base de leurs profils isoenzymatiques, avec génotypes homozygotes correspondant aux hétérozygotes des hybrides supposés.

L'amplification de l'ADN avec les six primers donnent des résultats qui sont tout à fait en faveur de l'hypothèse d'hybridation .

Pour le primer A5, les profils obtenus chez les hybrides correspondent à la somme des bandes trouvées chez les deux stocks de référence : *Leishmania braziliensis* et *Leishmania panamensis* (voir photo 2). Pour les autres primers, on obtient des bandes surnuméraires dans certains cas, et dans d'autres cas l'absence de certaines bandes (exemple du primer A5 et A7, voir photo 2).

Mais leurs profils restent toujours proches de la combinaison des deux génotypes de référence.

Comme pour l'échantillon du Pérou, on observe pour cette série très limitée de stocks un polymorphisme plus important que celui observé par la méthode isoenzymatique. En effet, sur cette série de 4 stocks, nous observons seulement 2 zymodèmes différents, et 4 RAPDèmes différents.

Les résultats obtenus en RAPD corroborent bien ceux des isoenzymes. Ainsi nous montrons par les deux méthodes d'analyse que nos souches apparaissent comme des hybrides. Cependant, ceci n'est pas vérifié pour tous les loci, ou tous les primers (bandes surnuméraires ou absentes). Il est probable qu'il ne s'agisse pas d'une sexualité mendélienne classique.

Tableau 3
Génotypes obtenus par la méthode RAPD pour les hybrides putatifs d'Equateur.

souches	primer A1	primer A4	primer A5	primer A7	primer A10	primer A15
L.panamensis	1-2-5	1-2-3-4	2	1-2-5-6	1-2-3-4-6-7-8	1-3
L.braziliensis	2-3-4-5	1-3-4	1-3	1-3-6	5-8-9-10	4-6
Z9	1-2-3-5	1-3-4	1-2-3	1-2-3-5-6	1-5-8-9-10-11-12	1-3-4
P5	1-2-3-5	1-3-4	1-2-3	1-2-3-5-6	1-5-8-9-10-12	1-2-3-4-5
E102	1-2-3-5	1-3-4	1-2-3	1-2-3-4-5-6	5-9-10-11	3-4
Z5	1-2-3-5	1-3-4	1-2-3	1-2-3-5-6	5-9-10-11-12	1-3-4

V. Discussion :

5.1. Les hybrides putatifs :

5.1.1. au Pérou :

Ces stocks du Pérou ont été étudiés par caryotypage moléculaire par Dujardin et al. (sous presse), au moyen des sondes pLb-22 et pLb-168. Ces données montrent une structuration géographique nette. En effet, il existe un profil caryotypique particulier au Nord du Pérou (P4), un profil (P2) au Sud, et dans la région centrale des profils recombinants (Annexe 3). Ces données évoquent les résultats obtenus par Bastien et al. (32) sur des souches de *Leishmania infantum* dans les Pyrénées Orientales. Notre étude sur ces stocks par les méthodes, isoenzymatique et RAPD ne nous apporte pas d'éléments pour confirmer cette hypothèse. Ceci pour montrer le "divorce" entre les données obtenues en champ pulsé d'une part, les données isoenzymes et RAPD d'autre part (voir Annexe 3 et 4). En effet, les recombinants putatifs dans la région centrale (unités biogéographiques 3 et 4) du Pérou ne présentent aucun locus hétérozygote en isoenzymes. Par ailleurs, l'examen des Annexes 3 et 4 montre que les données isoenzymatiques et RAPD ne sont pas corrélés aux données en champ pulsé. En effet, dans un même génotype obtenu en champ pulsé (génotype parental P4), on trouve une variabilité considérable aussi bien par les isoenzymes que par les RAPD, avec même présence d'espèces différentes. Prenons les 3 séries définies par le champ pulsé: (i) hybride parental P2; (ii) hybride parental P4; (iii) hybrides recombinants. Les génotypes correspondants, aussi bien en isoenzymes qu'en RAPD, ne peuvent être considérés comme répondant à ces statuts de parents et de recombinants. Dans ce cas, l'hypothèse de recombinaison n'est donc pas corroborée par nos marqueurs. Nous n'avons pas d'explication à proposer pour le phénomène insolite révélé par l'analyse en champ pulsé. Le caryotype analysé seulement avec deux sondes chromosomiques semble évoluer indépendamment de la variabilité des gènes codant pour les isoenzymes et l'organisation du génome (RAPD). Le champ pulsé n'a en effet aucun pouvoir prédictif sur les résultats obtenus en isoenzymes et en RAPD. Le seul lien entre résultats obtenus par champ pulsé d'une part, isoenzymes et RAPD d'autre part, est que la distribution en zymodèmes et RAPDèmes semble suivre une certaine structuration nord-sud, ce qui recoupe les résultats de champ pulsé sur ce point précis.

5.1.2. En Equateur :

Les données obtenues en isoenzymes puis en RAPD nous révèlent des stocks à caractère hybride. L'observation de ces hybrides putatifs concorde avec des résultats précédents obtenus dans l'Ancien Monde (3). Cependant, à notre connaissance, c'est la première fois que ces phénomènes d'hybridation sont étudiés par analyse RAPD. Les comparaisons avec les souches de référence choisies comme types parentaux évoquent une recombinaison entre *Leishmania panamensis* et *Leishmania braziliensis* (6). Il faut souligner que ces deux espèces appartiennent à deux complexes différents selon la classification OMS de 1990 : *Leishmania braziliensis* au complexe *Leishmania braziliensis*, et *Leishmania panamensis* au complexe *Leishmania guyanensis*. Les stocks de

référence pris ici comme génotypes parentaux n'ont pas été isolés en Equateur, mais se sont avérés les plus aptes à représenter un profil parental. Il faudrait réaliser un échantillonnage plus important en Equateur pour chercher l'existence de ces génotypes, ou même, des génotypes encore plus proches des types parentaux théoriques.

Les isoenzymes donnent des profils typiques d'hétérozygotie pour seulement deux loci (voir Annexe 3) : La *Nhl-a* et la *Pgm*. Les RAPD montrent pour les hybrides putatifs une certaine combinaison des profils parentaux (voir photo 2). On obtient aussi des bandes non parentales. On peut également constater l'absence de certaines de ces bandes. Les bandes non parentales ne sont pas en désaccord avec une recombinaison. En effet, l'héritance mendélienne du polymorphisme RAPD est encore mal connue. Riedy, Hamilton & Aquadro (33) observent dans une population de primates, des bandes non parentales dans la descendance. L'absence de certaines bandes parentales, suggère que les stocks ne sont pas un mélange de deux souches. Ceci est corroboré par le fait qu'à certains loci enzymatiques, pour ces génotypes recombinants, on n'observe pas des profils à deux bandes, mais soit un génotype homozygote parental, soit l'autre (Annexe 3).

L'aspect très spécial des génotypes RAPD de ces recombinants suggère souvent une juxtaposition des deux génotypes parentaux. Ce phénomène est peut-être similaire à celui qu'on observe chez les recombinants de *Trypanosoma brucei* obtenus au laboratoire (34). Ces recombinants apparaîtraient en effet comme des tétraploïdes, résultant de la juxtaposition des deux génotypes parentaux, eux-mêmes diploïdes. Nous comptons mesurer la quantité d'ADN de ces recombinants par rapport aux génotypes parentaux pour vérifier cette hypothèse. De nombreux travaux seront nécessaires pour mieux cerner la nature de ce processus sexué. Il pourrait s'agir de parasexualité, avec recombinaison n'intéressant qu'une partie du génome, à la différence de la sexualité mendélienne classique. Toujours est-il que l'existence de processus sexués chez les *Leishmania* semble établie. La question ouverte maintenant est d'estimer l'impact réel de ces phénomènes dans la nature. En effet, dans le cas de la plupart des bactéries, les phénomènes de recombinaison qu'on observe aisément au laboratoire n'ont qu'un impact épisodique dans les populations naturelles, qui ont une structure clonale. Dans le cas des *Leishmania*, des déséquilibres de liaison considérables ont été trouvés, en particulier chez *Leishmania infantum* (2). Dans le présent travail, nous avons noté l'existence de tels déséquilibres de liaison, en particulier au Pérou chez *Leishmania peruviana* avec les données RAPD, et en Equateur chez *Leishmania panamensis* avec les données isoenzymatiques. Cependant, il faut interpréter ces données avec prudence. L'échantillonnage au départ n'a pas été conçu pour une étude de génétique des populations, et les conditions de sympatrie ne sont pas parfaitement remplies. Nous avons vu que la distribution des génotypes était passablement structurée en fonction de la distance géographique. Il est probable que ce fait interfère dans la genèse des déséquilibres de liaison. Une étude au long cours de génétique des populations reste à faire pour trancher cette question de la structure populationnelle des *Leishmania*, avec une conception rationnelle de l'échantillonnage dès le départ. La haute résolution du marquage RAPD sera très précieuse dans une telle étude. C'est là le projet de thèse que nous proposons.

L'estimation du statut réel des phénomènes de recombinaison dans les populations naturelles de

Leishmania a une grande importance épidémiologique et médicale. Si ces phénomènes sont beaucoup plus fréquents que ne le laissait supposer le modèle clonal, les génotypes mis en évidence par nos marqueurs sont instables. Plus ils sont instables, plus ils sont assimilables à des variants individuels, et plus leur importance épidémiologique diminue. Par ailleurs, à la faveur d'épisodes de recombinaison, même rares, il peut s'opérer d'un clone à l'autre des transferts de gènes portant des caractères médicalement importants comme la résistance à certains médicaments ou la virulence.

5.2. Valeur de la méthode RAPD :

Les données obtenues au Pérou en particulier montrent que cette méthode est plus résolutive que l'électrophorèse d'isoenzymes. Bien que la technique d'électrophorèse utilisée ici repose sur l'analyse d'un nombre important de loci, on voit qu'un même zymodème peut renfermer des génotypes en fait assez diversifiés. Tibayrenc et Ayala (7) ont insisté sur le fait que les zymodèmes des protozoaires parasites devaient être considérés plutôt comme des familles de clones étroitement apparentés que comme de véritables clones. Notre travail va dans ce sens. Il faut rappeler ici la notion de clonet (30): on désigne ainsi, dans une espèce à reproduction clonale, tous les isolats apparaissant identiques entre eux sur la base d'une série donnée de marqueurs génétiques : les zymodèmes de *Leishmania* sont des clonets plutôt que des clones, et il en va de même très probablement de nos RAPDèmes, appelés eux-mêmes à éclater quand une technique plus résolutive sera employée.

Pour des études phylogéniques, le mode d'emploi des RAPD sera différent de celui des isoenzymes : nous avons vu que la variabilité RAPD pour un même échantillonnage de stocks est supérieure à celle que révèlent les isoenzymes. Cela signifie que ces derniers marqueurs évoluent plus lentement. Les isoenzymes seront donc mieux adaptés pour distinguer les grands branchements, les clades d'un niveau supérieur, tandis que les RAPD seront plus résolutifs pour explorer la variabilité à l'intérieur de chaque clade. Cependant, cette assertion demandera probablement à être nuancée dans le futur. En effet, il est probable que certains primers se révéleront peu variables, et pourront être utilisés comme marqueurs d'espèces. Tibayrenc et al. (24) ont ainsi montré chez *Trypanosoma cruzi* de tels caractères RAPD synapomorphes, dont certains étaient spécifiques de l'espèce, tandis que d'autres étaient spécifiques de grandes subdivisions au sein de l'espèce. Il semble que ce soit également le cas, dans notre étude, Le primer A1 est très peu variable pour *Leishmania peruviana*, tous les autres profils présentent une plus grande variabilité. De tels fragments RAPD synapomorphes sont des outils potentiels pour élaborer des sondes spécifiques de clades ou d'espèces.

Bien que les RAPD montrent une variabilité plus forte que les isoenzymes, les résultats des deux méthodes se recoupent largement : les grands embranchements des arbres obtenus par les deux approches sont similaires (Figure 1). D'autre part, les génotypes qui sont identiques ou apparentés en isoenzymes tendent à l'être également en RAPD, tandis que les génotypes très dissemblables en isoenzymes le sont également en RAPD. Ceci est illustré par la corrélation retrouvée entre les deux séries de distances pour toutes les paires de stocks possibles (voir résultats 4.1.3.)

VI. Conclusion :

Cette étude nous a permis tout d'abord d'illustrer la valeur de l'analyse RAPD pour la caractérisation génétique des stocks de *Leishmania*. Cette nouvelle méthode, au pouvoir de résolution virtuellement illimité, vient en complément des isoenzymes, et sera d'une valeur spécialement grande pour les études de génétique des populations.

Nous avons par ailleurs apporté de nouvelles informations sur la variabilité génétique des *Leishmania* au Pérou et en Equateur, en continuation du travail de Guerrini (6).

Mais surtout, car c'était là son but premier, ce travail nous a permis de mieux cerner la nature biologique de deux séries de variants génétiques qui avaient été supposés être des recombinants par d'autres auteurs. Cette hypothèse n'a pas été corroborée par nos résultats dans le cas des recombinants qui avaient été postulés par Dujardin et al. (sous presse) au Pérou par l'analyse en champ pulsé. Il reste à trouver une explication aux mystérieux phénomènes décrits par Dujardin et al. (sous presse) à l'aide de cette dernière technique, phénomènes apparemment similaires à ceux qu'avaient observés Bastien, Blaineau et Pagès (5) chez *L. infantum*.

Par contre, le marquage RAPD a confirmé les résultats isoenzymatiques de Guerrini (6) : les stocks isolés dans le sud de l'Equateur semblent bien résulter d'une hybridation entre *Leishmania panamensis* et *Leishmania braziliensis*, deux espèces qui appartiennent à deux complexes différents : le complexe *Leishmania guyanensis* et le complexe *leishmania braziliensis* respectivement.

Il reste maintenant à apprécier l'impact réel de ces phénomènes dans les populations naturelles de *Leishmania*. A ce jour, aucune étude n'a été conçue dès le départ, en termes d'échantillonnage, pour jeter les bases d'une véritable génétique des populations des *Leishmania*, seule apte à trancher cette question. C'est là le projet de thèse que nous proposons maintenant.

VII. Projet de recherche :

Titre du projet : Génétique des populations des *Leishmania* en Bolivie et au Pérou. Implications épidémiologiques.

Directeur de thèse : Michel Tibayrenc

Cadre logistique : UMR CNRS - ORSTOM 9926 "Génétique Moléculaire des parasites et des Insectes Vecteurs". Centre de recherche ORSTOM.

Le sujet du DEA et celui de la thèse sont en continuité directe : le DEA a constitué réellement la 1^o année de la recherche expérimentale dont la thèse verra l'aboutissement.

7.1. Projet :

Le mode de reproduction des *Leishmania* dans leurs populations naturelles fait actuellement l'objet de vives controverses. Dans le cadre général d'une "théorie clonale des protozoaires parasites", notre équipe a présenté l'hypothèse que les populations de *Leishmania* sont subdivisées en clones naturels, stables dans l'espace et dans le temps (2; 30). Ce modèle ne postule pas que la recombinaison génétique est absente des populations naturelles du parasite, mais simplement, qu'elle n'est pas suffisamment fréquente pour empêcher la genèse et la propagation de ces clones naturels.

Cette hypothèse a été vivement controversée sur la base de données d'électrophorèse en champ pulsé, semblant montrer que la recombinaison génétique dans certaines populations de l'Ancien Monde est un phénomène fréquent (5).

Notre travail de DEA visait à clarifier le statut biologique de certains variants de *Leishmania* isolés au Pérou et en Equateur, qui avaient été soupçonnés par d'autres auteurs d'être le résultat d'échanges sexuels. L'hypothèse de recombinants naturels au Pérou postulée sur la base de données de champs pulsés n'a pas été corroborée par les résultats que nous avons obtenus par électrophorèse d'isoenzymes et par amplification de l'ADN par amorces aléatoires (random amplified of polymorphic DNA, or RAPD). Par contre, nos résultats supportent l'hypothèse d'hybrides entre *Leishmania panamensis* et *Leishmania braziliensis* en Equateur, un phénomène apparemment similaire à celui qui a été décrit par Evans et al. (3) dans l'Ancien Monde, et qui pourrait être mis en relation avec les fusions cellulaires observées par Lanotte & Rioux (4).

La controverse développée autour de cette question (35; 36) a eu le mérite d'attirer l'attention sur le fait que dans le cas de *Leishmania*, on ne dispose pas d'échantillonnage parfaitement satisfaisant pour répondre à la question posée.

Cette question est : quel est l'impact d'éventuels phénomènes sexuels (dont l'existence est corroborée par les résultats de notre DEA) sur la structure des populations naturelles du parasite, ou en d'autres termes : existe-t-il dans les populations de *Leishmania* des lignées parasitaires

isolées génétiquement les unes des autres, stables dans l'espace et dans le temps (clones)?

L'importance d'une telle question en épidémiologie et en médecine est considérable : si de telles lignées existent, elles sont susceptibles de différer grandement quant à leurs propriétés médicalement importantes (virulence, résistance aux drogues). Du reste, un des buts du programme CEE STD3 qui finance notre projet est d'établir les liens qui existent entre les formes cliniques de la Leishmaniose et les variants génétiques des parasites isolés de patients. Par ailleurs, ces lignées clonales, si elles existent, peuvent être utilisées comme marqueurs pour le suivi des trainées épidémiologiques ("epidemiological tracking"). En effet, du fait qu'elles se propagent inchangées d'une génération à l'autre ("génotypes congelés", ou "blocs de gènes"), et qu'elles sont donc stables dans l'espace et dans le temps, on peut aisément les marquer par des sondes spécifiques. Si les phénomènes sexués étaient très fréquents, les génotypes du parasite seraient instables, et donc impropres pour ces marquages épidémiologiques.

Le propos du présent travail est donc de trancher cette question, par l'analyse de sondages spécialement conçus pour la génétique des populations. Deux catégories de sondages sont nécessaires : (a) des échantillons collectés en conditions strictes de sympatrie, pour tester rigoureusement l'hypothèse clonale; (b) des échantillons allopatriques, pour évaluer la stabilité dans l'espace des génotypes du parasite.

7.2. Zone d'étude :

Les deux pays retenus pour le projet sont la Bolivie et le Pérou, dans lesquels notre équipe dispose de collaborations bien rôdées (voir plus loin : financement). Des sondages complémentaires pourront être faits dans des buts de comparaison dans deux pays voisins : l'Equateur (projet CEE : "Leishmaniasis in Ecuador: transmission cycles and epidemiology") et la Colombie (collaboration avec l'équipe de Cali, Dr Nancy Saravia).

7.3. Techniques :

Comme dans le cadre de notre DEA, les souches seront analysées par deux techniques génétiques: (a) l'électrophorèse d'isoenzymes multilocus (21); (b) les random primers, ou RAPDs (24).

7.4. Analyse de génétique des populations :

Le marquage génétique fin permis par ces deux techniques complémentaires nous permettra d'appliquer dans les meilleures conditions les tests spécifiques de génétique des populations développés par notre équipe pour tester l'hypothèse clonale (2; 37). Ces tests sont tous basés sur l'étude de deux phénomènes biologiques, dont la rareté ou l'absence sont des arguments indirects en faveur d'une propagation clonale. Ces deux phénomènes sont: la ségrégation des allèles à des loci donnés (dont l'absence est traduite par des déviations par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg), et la recombinaison des génotypes d'un locus à l'autre (dont l'absence se manifeste par un déséquilibre de liaison).

7.5. Echéancier :

La première année (DEA) nous a permis, comme prévu, de faire l'acquisition des techniques (cultures de parasites, isoenzymes, RAPDs) et des bases théoriques (génétique des populations) nécessaires à la conduite du programme, tout en éclaircissant la nature biologique de certains variants suspectés par d'autres auteurs comme résultant d'échanges sexuels. La thèse sera alors consacrée à l'analyse d'un échantillonnage extensif qui permettra de répondre de façon fiable à la question posée (impact réel des phénomènes sexuels dans les populations naturelles), au moins en ce qui concerne les *Leishmania* de cette zone géographique. La méthodologie développée sera immédiatement applicable à l'étude d'autres faciès épidémiologiques.

7.6. Financement :

Ce programme est supporté par un projet communautaire STD3, qui permet de couvrir les frais de fonctionnement (titre: "Clonal variability of the parasite as a predictive tool for different clinical manifestations in tegumentary leishmaniasis of Peru and Bolivia"; partenaires: (a) Universidad de Cochabamba, Bolivie; (b) Instituto Alexander Von Humboldt de Lima, Pérou; (c) Institut de Médecine tropicale d'Anvers.

Bibliographie

1. Mayr, E. 1940. Speciation phenomena in birds. *Am. Nat.*, **74**, 249-278.
2. Tibayrenc, M., Kjellberg, F. and Ayala, F.J. 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 2414-2418.
3. Evans, D.A., Kennedy, W.P.K., Elbihari, S., Chapman, C.J., Smith, V. and Peters, W. 1987. Hybrid Formation within The Genus *Leishmania*? *Parasitologia*, **29**, 165-173.
4. Lanotte, G. and Rioux, J.A. 1990. Fusion cellulaire chez les *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). *C.R. Acad. Sci. Paris*, **310**, (Série III), 285-288.
5. Bastien, P., Blaineau, C. and Pagès, M. 1992. *Leishmania*: sex, lies and karyotype. *Parasitology Today*, **8**, (5), 178-181.
6. Guerrini, F. 1993. Génétique des Populations et Phylogénie des *Leishmania* du Nouveau Monde. Thèse de Doctorat d'Université, Université des Sciences et Techniques du Languedoc. pp 111.
7. Tibayrenc, M. and Ayala, F.J. 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution*, **42**, (2), 277-292.
8. Walliker, D. 1985. Characterization of *Plasmodium falciparum* of different countries. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, **65**, 69-77.
9. Peters, W. and Killick-Kendrick, R. 1987. The Leishmaniases in Biology and Medecine. I Biology and Epidemiology, *Academic Press*, pp 550.
10. Saf'janova, W.M. 1982. Classification of the genus *Leishmania*. Ross. In: *Leishmania. Protozoology, Part 7, Academy of Sciences, USSR All Union Society of Protozoologists, Leningrad*, pp 220.

11. Lainson, R. and Shaw, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis. (Peters, W.; Killick-Kendrick, R. eds). *Academic Press, London*, 1, 1-120.
12. Franke, D.E., Lucas, M.C., Tovar, A.A., Kruger, J.H., Seminario De Rivera, M.V. and Wignall, F.S. 1990. Diffuse cutaneous Leishmaniasis acquired in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **43**, (3), 260-262.
13. Armijos, R.X., Chico, M.E., Cruz, M.E. Guderian, R.H., Kreutzer, R.D., Berman, J.D., Rogers, M.D. and Grögl, M. 1990. Human cutaneous Leishmaniasis in Ecuador : identification of parasites by enzyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , **42**, 424-428.
14. Grimaldi, G.J., Kreutzer, R.D. Hashiguchi, Y., Gomez, E.A., Mimory, T. and Tesh, R.B. 1992. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infected arboreal mammals in Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **87**, (2), 221-228.
15. Tibayrenc, M. 1979. Les isoenzymes et l'entomologie médicale. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, **XVII**, 249-256.
16. Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J. and Britton-Davidian, J. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèses des protéines. *Lavoisier Ed. Techn. Doc., Paris*, pp. 232.
17. Harris, H. and Hopkinson, D.A. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. *North-Holland Publishing Co., Amsterdam*.
18. Richardson, B.J., Baverstock, P.R., and Adams, M. 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies. *Academic Press Australia (Harcourt Brace Jovanovich, Publishers)*, pp 410.
19. Lanham, S.M., Grendon, J.M., Miles, M.A., Povoas, M.M and De Souza, A.A. 1981. A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of trypanosomatids. In: Standards stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 742-750.

20. Tibayrenc, M., Cariou, M.L., Solignac, M., Dedet, J.P., Poch, O., and Desjeux, P. 1985. New electrophoresis evidence of genetic variation and diploidy in *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **77**, 68-73.
21. Ben Abderraazak, S., Guerrini, F., Mathieu-Daudé, F., Truc, P., Neubauer, L., Lewicka, K., Barnabé, C. and Tibayrenc, M. Isoenzyme electrophoresis for parasite characterization. In: *Protocols in Molecular Parasitology, The Humana Press.*: sous presse.
22. Godfrey, D.G. and Kilgour, V. 1979. Enzyme elctrophoresis in characterizing the causative agent of Gambian Trypanosomias. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**, 217-225.
23. Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, **1**, 55-63.
24. Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D. and Ayala, F.J. 1993. Genetic characterization of six parasitic protoza: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 1335-1339.
25. Williams, J.G.K. Kubelick, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, V.S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**, (22), 6531-6535.
26. Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, V.S. 1991. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology*.
27. Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. vaudoise Sci. Nat.* **44**, 223-270.
28. Serres, E. and Roux, M. 1986. Pratique de la classification automatique. L'exemple de *Leishmania*. In: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques* (Colloques Int. CNRS/INSEERM, 1984) *.I MEEE, Montpellier*, 27-40.
29. Lamas, G. A preliminary Zoogeographical Division of Peru, Based on Butterfly Distributions (Lepidoptera, Papilionoidea). 336-357.
30. Tibayrenc, M., Kjellberg, F. and Ayala, F.J. 1991. The clonal theory of parasitic protoza. *BioScience*, **41**, 767-774.

31. Hashiigushi, Y. and Gomez Landires, E.A. 1991. A review of Leishmaniasis in Ecuador. *Bull. Pan. Am. Hlt. Org.*, **25**, 64-76.
32. Bastien, P., Blaineau, C., Taminh, M., Rioux, J.A. Roizès, G. and Pagès, M. 1990. Interclonal variations in molecular karyotype in *Leishmania infantum* imply a 'mosaic' strain structure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **40**, 53-62.
33. Riedy, M.F., Hamilton, W.J. and Aquadro, C.F. 1992. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Research*, **20**, 1.
34. Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart, B., Le Page, R.W.F., Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E. and Steinert, M. 1986. Hybrid formation between African Trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, **322**, 173-175.
35. Tibayrenc, M. 1992. *Leishmania*: Sex, Karyotypes and Populations Genetics. *Parasitol. Today*, **9**, 305-306.
36. Pagès, M., Bastien, P. and Blaineau, C. 1992. *Leishmania*: Sex, Karyotypes and Populations Genetics: reply. *Parasitol. Today*, **9**, 306.
37. 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 vantage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5129-5133.

ANNEXES

ANNEXE 1

Noms et Codes d'identification des systèmes enzymatiques étudiés :

Nom	Abréviation	Code
Aconitase	ACON	E.C.4.2.1.3.
Alanine amino transférase	ALAT	E.C.2.6.1.2
Glutamate oxaloacétate transaminase	GOT	E.C.2.6.1.1
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	G6PD	E.C.1.1.1.49.
Glucose-phosphate isomérase	GPI	E.C.5.3.1.9.
Isocitrate déshydrogénase	IDH	E.C.1.1.1.42.
Malate déshydrogénase	MDH	E.C.1.1.1.37.
Enzyme malique	ME	E.C.1.1.1.40.
Mannose-phosphate isomérase	MPI	E.C.5.3.1.8.
Nucléoside hydrolase 1	NH1	E.C.2.4.2.
Nucléoside hydrolase 2	NH2	E.C.2.4.2.
Peptidase 1	PEP1	E.C.3.4.11 ou 13
Peptidase 2	PEP2	E.C.3.4.11 ou 13
Phosphogluconate déshydrogénase	6PGD	E.C.1.1.1.44.
Phosphoglucomutase	PGM	E.C.2.7.5.1.

Conditions électrophorétiques :

Enzyme	Tampon	Imbibition	Migration	Voltage	Temps
ACON	E	20/80	50/50	120V	25'
ALAT	D	50/50	pur	200V	30'
G6PD	B	pur	pur	200V	20'
GPI	A	50/50	pur	200V	20'
GOT	A	50/50	pur	160V	25'
IDH	A	25/75	pur	160V	25'
MDH	B	pur	pur	200V	30'
ME	A*	25/75	pur	160V	25'
MPI	B	50/50	pur	200V	20'
NH1	A	75/25	pur	200V	30'
NH2	A	75/25	pur	200V	25'
PEP1	A	pur	pur	200V	20'
PEP2	A	pur	pur	200V	20'
6PGD	C	25/75	25/75	200V	25'
PGM	A	25/75	pur	200V	20'

- * nécessite l'addition de $MgCl_2$:

Tampons de migration et d'imbibition :

Tampon	Composition
A	Tris-Versene-Borate 0,5 M pH 8
B	Tris-Barbital-Sodium Barbital (HR Helena) pH 9
C	Tris 0,01 M -Ac. maléique 0,1 M -EDTA 0,01 M - $MgCl_2$ 0,01 M pH 8,6
D	Tris 0,66 M -Ac. citrique 0,083 M pH 8,6
E	Ac. citrique 0,15 M - NaH_2PO_4 0,24 M pH 6

ANNEXE 2

Solutions de révélation :

Enzyme	T. réaction	Solution de coloration
ACON	2 (1/4)	ac. cis-aconitique 20mg, isocitrate déshydrogénase 3UI, MgCl ₂ 50mg, NADP 5mg, MTT 1,2mg, PMS 3mg.
ALAT	3	ac. alpha-kétoglutarique 5 mg, L-alanine 10mg, lactate déshydrogénase 15 UI, NADH 2mg. Visualisation en UV.
GOT	2 (1/10)	L.ac.aspartique 25mg, ac. alpha-kétoglutarique 20mg, pyridoxal 5-phosphate 3mg, fast blue BB salt 20mg.
G6PD	1 (1/2)	D-glucose 6 phosphate 5mg, MgCl ₂ 50mg, NADP 5mg, MTT 1,2 mg, PMS 3mg.
GPI	1 (1/4)	fructose 6-phosphate 10mg, glucose 6-phosphate déshydrogénase 5UI, MgCl ₂ 50mg, NADP 5mg, MTT 1,2mg, PMS 3mg
IDH	2 (1/10)	DL-ac. isocitrique 10mg, MgCl ₂ 50mg, NADP 5mg, MTT 1,2mg, PMS 3mg.
MDH	2 (1/10)	ac. malique 1M pH 7 0,9ml, NAD 4mg, MTT 1,2mg, PMS 3mg.
ME	1 (1/4)	ac. malique 1M pH 7 0,6ml, MgCl ₂ 50mg, NADP 5mg, MTT 1,2mg, PMS
MPI	1 (1/4)	mannose 6-phosphate 20mg, glucose phosphate isomérase 10UI, glucose 6-phosphate déshydrogénase 10UI, MgCl ₂ 50mg, NADP 5mg, MTT 1,2mg, PMS 3mg.
NH1	2 (1/10)	inosine 10mg, xanthine oxydase 0,6 UI, MTT 1,2mg, PMS 3mg.
NH2	2 (1/10)	déoxinosine 20mg, xanthine oxydase 0,6 UI, MTT 1,2mg, PMS 3mg.
PEP1	2 (1/10)	L-leucine-leucine-leucine 5mg, L-amino ac. oxydase 1mg, peroxydase 1mg, MgCl ₂ 50mg, MnCl ₂ 5mg, 3-amino-9-éthyl carbazole* 10mg.
PEP2	2 (1/10)	L-leucyl-L-alanine 5mg, L-amino ac. oxydase 1mg, peroxydase 1mg, MgCl ₂ 50mg, MnCl ₂ 5mg, 3-amino-9-éthyl carbazole* 10mg.
6PGD	2 (1/4)	6-phosphogluconique 10mg, MgCl ₂ 50mg, NADP 5mg, MTT 1,2mg, PMS 3mg.
PGM	2 (1/4)	D-glucose 1-phosphate 20mg, glucose 6-phosphate déshydrogénase 8UI, MgCl ₂ 50mg, NADP 5mg, MTT 1,2mg, PMS 3mg.

- T. réaction = Tampon de réaction; (*) = dilution.

- * = Le colorant est dilué préalablement dans 0,5 ml d'éthanol absolu.

Tampons de réaction :

T. réaction	Composon
1	Tris-HCl 1 M pH 7
2	Tris-HCl 1M pH 8
3	NaH ₂ PO ₄ 0,025 M, Na ₂ HPO ₄ 0,08 M pH 7

Annexe 3

Zymodèmes caractérisés sur la base de 17 loci polymorphes, unités biogéographiques et caryotypes des stocks du Pérou :

Souches	BGU	CP	P/R	Zym.	ACON	ALAT	G6PD	GPI	GOT	IDH	MDH	ME-1	MPI	NH1-a	NH1-b	NH2	6PGD	PGM	PEP1	PEP2	ME-2
HB 22	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
HB 31	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
HB 39	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
HB 44	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
HB 55	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
HB 56	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
HB 67	1	PA4	P	2	99	8	1-3-5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
HB 83	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
HB 86	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
LC 1446	2	PA4	P	3	5	7	4-5-6	4	4-6	7	16	8	8	5	1	6	5	10	4	3	11
LC 1447	2	PA4	P	3	5	7	4-5-6	4	4-6	7	16	8	8	5	1	6	5	10	4	3	11
LC 1448	2	PA4	P	3	5	7	4-5-6	4	4-6	7	16	8	8	5	1	6	5	10	4	3	11
LC 900	1	PA4	P	1	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	6	6	6	4	5	10
LC 443	3	PA1	R	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC 0292	3	PA4	P	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC 0468	3	PA8	R	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC 0447	3	PA1	R	5	5	8	5	4	4-6	11	16	8	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LH 115	3	PA5	R	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC 26	3	PA1	R	6	5	8	5	4	4-6	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LH 78	4	PA9	R	7	5	8	5	4	4	11	16	8	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LH 691	4	PA1	R	8	5	7	4-5-6	4	4-6	7	16	9	8	5	1	6	5	10	4	3	11
LH 696	4	PA2	P	7	5	8	5	4	4	11	16	8	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LH 760	4	PA9	R	9	5	8	5	4	4	11	16	8	8	2	6	8	6	6	4	5	99
LH 827	4	PA1	R	10	5	8	5	4	5-7	11	16	7	8	2	99	6	6	5	4	5	99
LC 1015	4	PA3	R	11	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	8	8
LC 106	4	PA2	P	12	5	8	5	4	4	11	16	6	8	2	6	8	6	6	4	5	10
SL5	4	PA2	P	13	5	8	5	4	4	12	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC A01	5	PA2	P	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC A04	5	PA2	P	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC A08	5	PA2	P	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC A09	5	PA2	P	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LC A11	5	PA2	P	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
LH 249	5	PA2	P	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10
La 36	5	PA2	P	4	5	8	5	4	4	11	16	7	8	2	6	8	6	6	4	5	10

- BGU = unités biogéographiques; CP = Champ Pulsé : caryotypes obtenus par J.C. Dujardin; P/R = profil Parental ou Recombinant; Zym. = zymodèmes.

Annexe 4
RAPdèmes des stocks du Pérou, caractérisés avec six primers :

Souches	BGU	RAPD.	primer A1	primer A4	primer A5	primer A7	primer A10	primer A15
HB 22	1	1	2-3-4-6	5-9	2-4-5-10-11-12	2-7-8-11	15-17-19-20	4-5
HB 31	1	2	2-3-4-6	4-6-9	2-4-5-10-11-12	2-7-8-11	15-17-19-20	4-5
HB 39	1	3	2-3-4-6	4-6-9	2-4-5-10-11-12	2-7-8-11	15-17-19-20	3-4-5
HB 44	1	4	2-3-4-6	4-6-9	2-4-5-13?	2-7-8-11	15-17-19-20	4-5
HB 55	1	2	2-3-4-6	4-6-9	2-4-5-10-11-12	2-7-8-11	15-17-19-20	4-5
HB 56	1	2	2-3-4-6	4-6-9	2-4-5-10-11-12	2-7-8-11	15-17-19-20	4-5
HB 67	1	5	2-4-6-7	1-4-6-8-9-12-13	2-3-11	9	2-4-5-10-15-17-19-20	4-5-6
HB 83	1	6	2-3-4-6	2-4-6-8-9	2-4-5-10-11-12	2-7-8-11	15-17-19-20	4-5
HB 86	1	7	2-3-4-6	4-5-9	2-4-5-10-11-12	2-7-8-11	14-15-17-20	4-5
LC 900	1	8	2-3-4-6	4-6-9	2-4-5-8-10-11-12	2-7-8-11	15-17-19-20	4-5
LC 1446	2	9	2-5-8-11	2-3-4-6-8-9-10	7-9	2-4-8-10-12	1-3-7-8-9-12-13-16	1-2-5
LC 1447	2	10	2-5-8-11	2-3-4-6-8-9-10	7-8-9	2-4-8-10-12	1-3-7-8-9-12-13-16	1-2-5
LC 1448	2	11	2-8	2-3-4-6-8-9-10	7-9	2-4-8-10-12	1-3-7-8-9-12-13-16-19-20	1-2-5
LC 443	3	12	2-3-4-6	2-4-7-8-9	2-4-5-8-10-11-12	2-7-11	11-15-17-18-20	5
LC 292	3	12	2-3-4-6	2-4-7-8-9	2-4-5-8-10-11-12	2-7-11	11-15-17-18-20	5
LC 468	3	13	2-3-4-6	2-4-7-8-9	2-4-5-8-10-11-12	2-7-11	15-17-20	5
LC 447	3	14	2-3-4-6	2-4-9	2-4-5-10-11-12	2-7-11	13-15-17-18-20	5
LH 115	3	15	2-3-4-6	2-4-5-9	2-4-5-8-10-11-12	2-7-11	11-13-15-17-20	5
LC 26	3	16	2-3-4-6	2-4-5-9	2-4-5-8-10-11-12	7-8-11	11-13-15-17-18-20	5
LH 78	4	17	2-3-4-6	2-4-8-9	2-4-5-8-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	4-5
LH 691	4	18	1-5-9	2-3-4-6-8-9	4-6	2-4-6-9	1-3-6-7-8-9-12	1-2-4
LH 696	4	19	2-3-4-6	2-4-9-11	1-2-5-8-10-11-12	2-3-5-7-11	17-20	4-5
LH 760	4	20	2-3-4-6-9	5-6-9-11	1-2-5-8-10-11-12	2-3-7-11	17-19-20	99
LH 827	4	21	2-3-4-6-9-10	2-4-9-11	1-2-5-8-10-11-12	2-6-7-11	11-17-20	5
LC 1015	4	22	2-3-4-6	2-4-6-9	2-5-8-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	5
LC 106	4	23	2-3-4-6	2-4-6-9	1-2-4-5-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	5
SL 5	4	23	2-3-4-6	2-4-6-9	1-2-4-5-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	5
LCA 01	5	24	2-3-4-6	2-4-6-9	2-4-5-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	5
LCA 04	5	24	2-3-4-6	2-4-6-9	2-4-5-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	5
LCA 08	5	24	2-3-4-6	2-4-6-9	2-4-5-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	5
LCA 09	5	25	2-3-4-6	2-4-6-9	2-4-5-10-11-12	2-7-11	17-19-20	5
LCA 011	5	26	2-3-4-6	2-4-6-9	2-4-5-10-11-12	1-2-3-7-11	17-19-20	5
LH 249	3	27	2-3-4-6	2-4-6-9	2-5-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	5
La 36	5	28	2-3-4-6	2-4-6-9	2-4-5-8-10-11-12	2-7-11	15-17-19-20	5

-RAPD. = RAPdèmes; BGU = unités biogéographiques.

Annexe 5
Zymodèmes des stocks d'Equateur, caractérisés sur la base de 16 loci polymorphes :

Souches	Zym	ACON	ALAT	G6PD	GPI	GOT	IDH	MDH	ME-1	MPI	NHI-a	NHI-b	NH2	6PGD	PGM	PEP-1	PEP-2
E102*	1	5	8	4-5-6	4	4	8	16	7	7	5	1-6	5-6	6	6-10	4	3
E107*	1	5	8	4-5-6	4	4	8	16	7	7	5	1-6	5-6	6	6-10	4	3
Z9	2	5	8	4-5-6	4	4	8	17	7	7	5	1-6	5-6	6	6-10	4	3
P5	1	5	8	4-5-6	4	4	8	16	7	7	5	1-6	5-6	6	6-10	4	3
Z5	1	5	8	4-5-6	4	4	8	16	7	7	5	1-6	5-6	6	6-10	4	3
E79	3	5	10	5-6-7	4	4	8	17	5	8	2	6	6	8	6	5	3
PL21*	4	1	10	12	5	7	5	16	7	5	2	1	6	8	1-3	4	3-9
PL2*	5	1	10	12	5	7	5	16	7	5	2	1	6	5	1-3	4	3-9
DOG1*	6	5	7	5-6-7	4	99	99	16	7	10	5	1	6	8	10	4	99
EK112*	7	5	8	4-5-6	4-5	7	7	16	7	8	5	1	6	8	10	4	3
EK665	8	5	8	4-5-6	4-5	2-6	7	16	5	8	5	1	6	8	10	4	3
EK747	9	5	8	5-6-7	4	4-6	5	16	7	8	5	1	6	99	10	4	3
EK649	10	5	8	5-6-7	4	4-6	8	16	5	8	5	1	6	6	10	4	3
E67	11	5	7	4-5-6	4-5	4	8	17	5	10	5	1	6	8	10	4	3
A8044*	12	5	8	4-5-6	4	4-6	8	16	7	8	5	1	6	6	10	4	3
E18*	13	5	8	4-5-6	4-5	2-4	8	16	5	8	5	1	6	8	10	4	3
E3*	14	5	8	6	4-5	2-4	8	16	7	8	5	1	6	8	10	4	3
E4*	13	5	8	4-5-6	4-5	2-4	8	16	5	8	5	1	6	8	10	4	3
E6*	14	5	8	4-5-6	4-5	2-4	8	16	7	8	5	1	6	8	10	4	3
E73*	15	5	8	4-5-6	4-5	4	8	15	5	8	5	99	6	8	10	3	3
E94	16	5	8	5-6-7	4	4-6	7	16	5	8	5	1	6	7	10	4	3
EK91*	17	5	8	4-5-6	4	1-4	8	16	7	8	5	1	6	8	10	4	3
E14*	18	5	10	4-5-6	4-5	4	8	16	7	8	5	1	6	99	10	4	3
E19*	18	5	10	4-5-6	4-5	4	8	16	7	8	5	1	6	99	10	4	3
E29*	18	5	10	4-5-6	4-5	4	8	16	7	8	5	1	6	99	10	4	3
E30*	19	5	10	4-5-6	4-5	4	8	16	7	8	5	1	6	8	10	4	3
E10	20	5	7	5	4	4-6	7	16	5	8	5	1	6	5	10	4	3
PR1	21	5	8	5-6-7	4	4-6	8	16	7	7	5	1	6	6	10	4	3
E12*	22	5	8	4-5-6	4-5	2-4	8	16	5	8	5	1	6	8	6	4	3
E72	23	5	8	5	4	4	8	17	3	6	2	6	5-6	7	6	4-6	99
E11	24	5	99	99	4-5	2	7	16	5	8	5	1	6	8	6	4	3
<i>L.panamensis</i>	25	5	7	5-6-7	4	4-6	8	16	7	8	5	1	6	8	10	4	3
<i>L.braziliensis</i>	26	5	8	5	4	4	11	17	5	7	6	6	6	6	6	4	3
<i>Lequatorensis</i>	27	1	10	13	4-5	4	5	16	11	6	2	b	5	5	5	4	9
<i>L.colombiensis</i>	28	1	10	13	4	3	5	18	7	6	99	1	99	5	5	4	9

- * sont les stocks étudiés par F. Guerrini en Isoenzymes (6)