

ACADEMIE ROYALE DES SCIENCES D'OUTRE-MER

**Leishmanioses au Pérou :  
signification éco-épidémiologique  
de la variabilité caryotypique**

par

**Jean-Claude DUJARDIN**

KONINKLIJKE ACADEMIE VOOR OVERZEESE WETENSCHAPPEN

1997





ACADEMIE ROYALE DES SCIENCES D'OUTRE-MER

Classe des Sciences naturelles et médicales

Mémoire in-8°, Nouvelle Série, Tome 24, fasc. 1, Bruxelles, 1997

**Leishmanioses au Pérou :  
signification éco-épidémiologique  
de la variabilité caryotypique**

par

**Jean-Claude DUJARDIN**

Laboratoire de Protozoologie  
Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold, Anvers

KONINKLIJKE ACADEMIE VOOR OVERZEESE WETENSCHAPPEN

Klasse voor Natuur- en Geneeskundige Wetenschappen

Verhandeling in-8°, Nieuwe Reeks, Boek 24, afl. 1, Brussel, 1997

---

Mémoire présenté au concours annuel 1995  
et couronné par la Classe des Sciences naturelles et médicales  
en sa séance du 27 juin 1995

Rapporteurs : MM. L. EYCKMANS, A. FAIN et M. WERY

---

Texte définitif déposé le 13 février 1997

ACADEMIE ROYALE  
DES  
SCIENCES D'OUTRE-MER

rue Defacqz 1 boîte 3  
B-1000 Bruxelles (Belgique)

KONINKLIJKE ACADEMIE  
VOOR  
OVERZEESSE WETENSCHAPPEN

Defacqzstraat 1 bus 3  
B-1000 Brussel (België)

☎ (02)538.02.11 & 538.47.72 — Fax (02)539.23.53

ISBN 90-75652-06-2  
D/1997/0149/1

## TABLE DES MATIERES

Avant-propos .....	5
Remerciements .....	6
Abréviations .....	8
Résumé .....	9
<b>1. Introduction générale aux leishmanies</b> .....	<b>11</b>
1.1. Définition .....	11
1.2. Diversité des leishmanies .....	11
1.2.1. Diversité extrinsèque .....	11
1.2.2. Diversité intrinsèque .....	15
1.3. Etudes éco-épidémiologiques .....	17
<b>2. Eco-épidémiologie descriptive des leishmanioses péruviennes</b> .....	<b>19</b>
2.1. Ecologie du Pérou .....	19
2.1.1. Géographie .....	19
2.1.2. Unités bio-géographiques .....	19
2.2. Epidémiologie des leishmanioses péruviennes .....	22
2.2.1. Clinique .....	22
2.2.2. Vecteurs et réservoir .....	24
2.2.3. Parasites .....	26
<b>3. Eco-épidémiologie fonctionnelle des leishmanioses péruviennes</b> .....	<b>29</b>
3.1. Objectifs .....	29
3.2. Etude génétique des parasites .....	29
3.2.1. Choix des caractères étudiés .....	31
3.2.2. Développement des outils nécessaires à l'étude de la variabilité caryotypique .....	31
3.3. Analyse génétique des populations naturelles de <i>L. braziliensis</i> et <i>L. peruviana</i> .....	37
3.3.1. Discrimination caryotypique de <i>L. braziliensis</i> et <i>L. peru-</i> <i>viana</i> .....	39
3.3.2. Comparaison du polymorphisme caryotypique chez <i>L. peruviana</i> et <i>L. braziliensis</i> .....	40
3.3.3. Structuration éco-géographique des populations de <i>L. peruviana</i> .....	41
3.3.4. Comparaison des variations caryotypique et isoenzyma- tique .....	43
3.3.5. Conclusion partielle .....	45

3.4. Association entre variabilité caryotypique et virulence .....	46
3.4.1. Différences de virulence entre caryodèmes .....	47
3.4.2. Etude des séquences nucléotidiques impliquées dans la variation caryotypique .....	47
3.4.3. Conclusion partielle .....	53
<b>4. Conclusion générale, hypothèses et perspectives .....</b>	<b>55</b>
4.1. Histoire naturelle et éco-épidémiologie des leishmanioses péru- viennes .....	55
4.2. Plasticité génomique et innovation .....	57
4.3. Perspectives .....	59
<b>5. Bibliographie .....</b>	<b>60</b>
<b>6. Annexes .....</b>	<b>67</b>

## AVANT-PROPOS

L'éco-épidémiologie est la discipline étudiant l'influence de différents facteurs (surtout écologiques) sur les maladies, leur fréquence, distribution et étiologie. Une étude originale sur ce sujet ne peut se limiter à la simple observation de différentes formes cliniques d'une maladie dans différents biotopes (éco-épidémiologie descriptive). Au contraire, comme le dit la définition, elle doit contribuer à la compréhension du pourquoi de cette association, donc à l'identification des courroies de transmission entre le milieu et l'issue clinique d'une maladie (éco-épidémiologie fonctionnelle). C'est dans ce sens que ce mémoire a été rédigé.

La question à laquelle tente de répondre ce mémoire a été posée au milieu d'un travail sur les leishmanies péruviennes initié depuis quelques années. Cependant, s'il avait fallu mettre sur pied une étude pour répondre spécialement à cette question, je crois que j'aurais également choisi comme modèle les leishmanioses péruviennes. En effet, d'un point de vue écologique, le continent sud-américain est le plus adéquat car, étant moins anthropisé que l'Ancien-Monde, il est écologiquement beaucoup plus hétérogène : rien qu'au Pérou par exemple, sur les 103 «zones de vie» écologiques proposées par Holdridge au niveau mondial, 84 ont été identifiées (LAMAS 1982). Les leishmanioses s'insèrent parfaitement dans ce contexte, puisqu'on les retrouve dans des milieux fort différents, qu'elles se traduisent par de nombreuses formes cliniques et qu'il y a une réelle nécessité à comprendre leur épidémiologie, vu le problème de santé qu'elles représentent : il s'agit d'une des 7 maladies parasitaires ciblées en priorité par le TDR (OMS), à laquelle sont exposées 350 millions de personnes, et dont souffrent 12 millions de personnes (ANONYME 1990).

L'objectif de ce travail est de montrer comment, dans un contexte obligatoirement pluridisciplinaire, l'analyse des caractères génétiques appropriés (les chromosomes en l'occurrence) des parasites permet de mieux comprendre dans quelle mesure des différences environnementales pourraient se répercuter jusqu'à la forme clinique d'une parasitose.



## REMERCIEMENTS

Ce travail représente une partie d'une thèse de Doctorat en Sciences, et a été effectué dans des environnements différents : l'Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold (IMTPL) d'Anvers, la Vrije Universiteit Brussel (VUB), l'Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMTA vH) de Lima, et diverses Unités Bio-géographiques péruviennes. Je voudrais avant tout exprimer ma profonde reconnaissance envers les maîtres qui guidèrent mon travail dans ces différents biotopes : Dominique Le Ray (IMTPL), qui fut l'initiateur de ce travail, m'enseigna la protozoologie médicale et me transmit avec enthousiasme son idéal de collaboration ; Raymond Hamers (VUB) et Jorge Arevalo (IMTA vH), qui m'enseignèrent les concepts et techniques de biologie moléculaire et me formèrent à les appliquer dans des conditions matérielles parfois difficiles ; Alejandro Llanos-Cuentas (IMTA vH), qui appuya la partie clinique et épidémiologique de ce travail, et me stimula à ne pas oublier que derrière le génome du parasite — passionnant pour le biologiste — il y avait une maladie à contrôler ; Gerardo Lamas (Universidad de San Marcos, Lima), spécialiste des lépidoptères et de la bio-géographie péruvienne, qui me permit d'effectuer une sélection rationnelle des aires d'échantillonnage de cette étude.

J'adresse également tous mes remerciements aux professeurs Luc Eyckmans et Humberto Guerra, qui m'ont accueilli dans leur Institution respective et initié la collaboration belgo-péruvienne dans laquelle s'inscrit ce travail.

Je voudrais ensuite exprimer toute ma gratitude envers ceux qui, par des discussions stimulantes, firent progresser ma réflexion : Gaston Matthyssens, qui guida mes premiers pas moléculaires ; Michel Tibayrenc, qui m'initia aux arcanes de la génétique des populations ; Jean-Pierre Dujardin, frère et collègue, qui m'aida à orienter mes stratégies de recherche ; Abraham Caceres et Enrique Perez, qui m'aidèrent à mieux connaître l'écologie des phlébotomes andins.

Ce travail n'aurait pu s'effectuer sans l'aide en matériel et en souches de nombreux collègues : D.C. Barker (University of Cambridge, Grande-Bretagne), H. Bermudez (Cumetrop, Cochabamba, Bolivie), M. Chance (Liverpool School of Tropical Medicine, Grande-Bretagne),

J.P. Dedet (Faculté de médecine, Montpellier, France), P. Desjeux (OMS, Genève, Suisse), D. Evans (London School of Tropical Medicine, Grande-Bretagne), J.A. Rioux (Faculté de médecine, Montpellier, France), J.J. Shaw (Instituto Evandro Chagas, Belém, Brésil), R. Urjel (Cenetrop, Santa Cruz, Bolivie), G. Van Eys (Rijksuniversiteit Limburg, Maastricht, Pays-Bas).

Ma reconnaissance va également à mes compagnons de «paillasse» : Françoise Guerrini et Anne-Laure Bañuls (ORSTOM, Montpellier), toutes deux engagées dans un travail-sœur à celui-ci, et qui m'apportèrent leurs précieuses données enzymatiques ; Kathleen Victoir (IMTPL), qui a récemment commencé à tester une des hypothèses décrites dans ce travail ; Bernard Couvreur, Clive Davies, Wessel Van der Loo.

Je suis redevable à toutes les personnes qui apportèrent leur soutien technique à ce travail : Simonne DeDoncker, qui m'appuya de son savoir-faire parasitologique et moléculaire ; André Denijs, Sabine Desaegeer, Diane Jacquet, Georges Timperman, Louis Van Tiggel, Etienne Withoek.

Toutes mes pensées vont vers mes parents, frères et sœurs, qui m'encouragèrent durant ces années de recherches. Enfin, je serai à jamais reconnaissant envers mon épouse Dominique, qui me supporta lors de mes nombreux moments de doute et de découragement et, à chaque fois, sut ranimer ma flamme ; je lui dois beaucoup d'être arrivé au bout de ce travail.

A tous, merci.

## ABREVIATIONS

- ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ADNk : ADN kinétoplastique  
ADNn : ADN nucléaire  
ADNr : ADN ribosomal  
bp : paire de bases  
BGU : Unité bio-géographique  
CSDI : Chromosomal Size Difference Index (Indice de différence de taille chromosomique)  
Gp63 : Glycoprotéine de 63 kilodaltons  
kb : kilobase  
LPG : Lipo Phospho Glycan  
PA : Peruvian Andes (Andes péruviennes, dénomination des caryodèmes de *L. peruviana*)  
PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérase en chaîne)  
PFG : Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis (Electrophorèse en champ pulsé)  
RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA (Amplification au hasard d'ADN polymorphe)  
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de taille des fragments de restriction)  
ssu : small subunit (petite sous-unité de l'ADN ribosomal)

## RESUME

Les leishmanioses péruviennes ont été utilisées comme modèle pour une étude originale de l'éco-épidémiologie d'une parasitose tropicale, à cause de l'importante bio-diversité des leishmanies et de l'hétérogénéité éco-géographique du Pérou. Cinq observations marquantes ont été effectuées. Premièrement, la lecture des données épidémiologiques de base selon une trame éco-géographique (Unités bio-géographiques ou BGU de Lamas) a montré que les différences environnementales étaient corrélées à des variations dans la clinique (métastase muqueuse ou non, taille et nombre de lésions) et dans l'endémisme des espèces d'insectes-vecteurs. Deuxièmement, l'analyse caryotypique des deux espèces de leishmanies endémiques (*L. braziliensis* et *L. peruviana*) a permis une discrimination génétique plus fine à un niveau infraspécifique que l'analyse isoenzymatique et a révélé différentes populations parasites d'un environnement à l'autre. Troisièmement, l'étude *in vitro* de ces mêmes populations a montré des différences dans leur virulence (taux de croissance) allant dans le même sens que les différences cliniques. Quatrièmement, l'analyse fine du contenu génétique des chromosomes variant entre ces populations a montré que des gènes codant pour des fonctions susceptibles de toucher à la virulence étaient réarrangés. Cinquièmement, toutes ces différences se présentent selon un gradient parallèle, partant probablement de la forêt vers le Sud des Andes, en passant par l'unique passe entre la forêt et la côte, située au Nord du Pérou : plus on s'éloigne de la forêt (via la passe), plus les populations de *L. peruviana* diffèrent de *L. braziliensis* dans leur constitution génétique et dans leurs propriétés biologiques. Ces observations convergentes ont permis la formulation d'une hypothèse éco-épidémiologique cohérente : (i) différents vecteurs se seraient adaptés aux différentes conditions écologiques de la forêt et des BGU andines, (ii) différentes populations génétiques de parasites se seraient adaptées à ces différents vecteurs, et (iii) certaines de ces différences génétiques touchant des fonctions clefs pourraient être responsables de différences dans la virulence des parasites. Une deuxième hypothèse, complémentaire à la première, suggère la signification adaptative de la variabilité chromosomique et souligne son rôle possible comme interface entre

les différences environnementales et cliniques. Selon cette hypothèse, (i) certains chromosomes seraient prédisposés à des réarrangements de par leur teneur en séquences répétées, (ii) ces réarrangements pourraient entraîner des avantages/désavantages sélectifs s'ils impliquent des gènes importants, (iii) ce qui pourrait expliquer l'adaptation de différents parasites à des environnements différents, (iv) ainsi que les différences de virulence. Les résultats obtenus dans ce travail démontrent la valeur de l'analyse caryotypique pour des études éco-épidémiologiques.

# 1. Introduction générale aux Leishmanies

## 1.1. DEFINITION

Les leishmanies sont des Protozoaires appartenant à l'Ordre des Kinétoplastidés et à la famille des Trypanosomatidés. Ce sont des parasites digénétiques, se présentant sous la forme de promastigotes (flagellés) dans le tube digestif de l'insecte vecteur (le phlébotome, famille des Psychodidés, Diptères) et d'amastigotes (sans flagelle apparent) dans les macrophages des hôtes, tous mammifères. On retrouve ces parasites en Amérique tropicale et subtropicale, en Afrique, en Inde, en Asie orientale et centrale, dans le bassin méditerranéen et dans certains pays voisins (LAINSON & SHAW 1987).

## 1.2. DIVERSITE DES LEISHMANIES

Le genre *Leishmania* est composé d'une trentaine d'espèces (Tableau 1). Cette taxonomie très complexe reflète l'extraordinaire diversité de ce groupe de parasites et est basée sur des caractères extrinsèques (essentiellement liés aux relations entre les parasites et hôtes/vecteurs) et intrinsèques (liés à la constitution génétique des parasites) (LUMSDEN 1974). La signification biologique de cette taxonomie est controversée à cause de l'impossibilité d'appliquer le critère d'espèce biologique à ces Protozoaires à reproduction essentiellement asexuée. Pour cette raison, certains préfèrent utiliser cette taxonomie comme un outil opérationnel avant tout (TIBAYRENC *et al.* 1990).

### 1.2.1. Diversité extrinsèque

La diversité extrinsèque s'exprime à tous les niveaux du cycle de vie des leishmanies.

**Ecologie.** Le cycle leishmanien est associé à de nombreux biotopes, allant des milieux xérophytes relativement domestiqués de l'Ancien Monde (WARD 1985) jusqu'à l'environnement hétérogène de la forêt amazonienne primaire (SHAW & LAINSON 1987).

**Relations hôte/vecteur.** Les leishmanies sont transmises par une centaine de vecteurs différents (GRIMALDI & TESH 1993) à de nombreux mammifères (depuis les édentés à l'homme, en passant par les singes,

**Tableau 1**

Taxonomie des leishmanies (d'après LAINSON & SHAW 1987)

**1. The subgenus *Leishmania* Saffjanova 1982**

Definition : With the characters of the genus : life-cycle in the insect host limited to the midgut and foregut of the alimentary tract : type-species *Leishmania (Leishmania) donovani* (Laveran and Mesnil, 1903) Ross, 1903. Old and New World.

The *Leishmania (L.) donovani* complex :

- L. (L.) donovani* (Laveran and Mesnil, 1903) Ross, 1903 (Old World).
- L. (L.) infantum* Nicolle, 1908 (Old World).
- L. (L.) chagasi* Cunha and Chagas, 1937 (New World).

Other possible species :

- L. (L.) archibaldi* Castellani and Chalmers, 1919. Sudan : in rodents, the genet, the serval-cat, and man.
- Leishmania (L.)* sp. Kenya : in man, and occasional dogs.
- Leishmania (L.)* sp. Eastern Pyrenees : in man.
- Leishmania (L.)* sp. Italy : in foxes and dogs.
- Leishmania (L.)* sp. Iraq : in canids and man.
- Leishmania (L.)* sp. China (Gansu) ; Inner Mongolia : in man.

Other species, outside the *donovani* complex :

- L. (L.) tropica* (Wright, 1903) Lühe, 1906.
- L. (L.) aethiopica* Bray, Ashford and Bray, 1973.
- L. (L.) gerbilli* Wang, Qu and Guan, 1964.
- L. (L.) major* Yakimoff and Schokhor, 1914 *emend.* Bray, Ashford and Bray, 1973
- Leishmania (L.)* sp. Namibia : in man and the sandfly *Phlebotomus rossi*.
- Leishmania (L.)* sp. Namibia : in the hyrax *Procavia capensis*.
- Leishmania (L.)* sp. Ethiopia : in the rodent *Arvicanthis* sp.

The *Leishmania (L.) mexicana* complex (New World).

- L. (L.) mexicana* Biagi, 1953 *emend.* Garnham, 1962.
- L. (L.) enriettii* Muniz and Medina, 1948.
- L. (L.) amazonensis* Lainson and Shaw, 1972.
- L. (L.) aristidesi* Lainson and Shaw, 1979 *emend.* Lainson and Shaw, 1986 (\*).
- L. (L.) venezuelensis* Bonfante-Garrido, 1980.
- Leishmania (L.)* sp. Dominican Republic : in man.
- Leishmania (L.)* sp. Belize, Central America : in man.

Possible additional members of the *L. (L.) mexicana* complex :

- L. (L.) pifanoi* Medina and Romero, 1959 *emend.* Medina and Romero, 1962.
- L. (L.) garnhami* Scorza *et al.* 1979.
- Leishmania (L.)* sp. Trinidad : in the sandfly *Lutzomyia flaviscutellata*, rodents and marsupials.

(\*) Due to an error, this appeared as *aristedesi* in 1979.

*Leishmania* (L.) sp. Vale do Ribeiro, São Paulo State, Brazil : in man.

*Leishmania* (L.) sp. Caratinga, Minas Gerais State, Brazil : in the rodent *Proechimys dimidiatus*.

*Leishmania* (L.) sp. Caratinga, Minas Gerais State, Brazil : in man.

The *Leishmania* (L.) *hertigi* complex (New World) :

*L. (L.) hertigi* Herrer, 1971.

*L. (L.) deanei* Lainson and Shaw, 1977.

## 2. The subgenus *Viannia* n. subgen.

*Definition* : With the characters of the genus : life-cycle in the insect host including a prolific and prolonged phase of development as rounded or stumpy paramastigotes and promastigotes, attached to the wall of the hindgut (pylorus and/or ileum) by flagellar hemidesmosomes with later migration of flagellates to the midgut and foregut. Type-species *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911 *emend.* Matta, 1916.

*Distribution* : the American tropics and sub-tropics.

The *Leishmania* (V.) *braziliensis* complex :

*L. (V.) braziliensis* Vianna, 1911 *emend.* Matta, 1916.

*L. (V.) guyanensis* Floch, 1954.

*L. (V.) panamensis* Lainson and Shaw, 1972.

*L. (V.) peruviana* Velez, 1913.

Unnamed species of the *L. (V.) braziliensis* complex :

*Leishmania* (V.) sp. Belize, Central America : in man.

*Leishmania* (V.) sp. Pará State, Brazil (south of the Amazon River) : in the sloth, *Choloepus didactylus*.

*Leishmania* (V.) sp. Itaituba, Pará State, Brazil : in the common opossum, *Didelphis marsupialis*.

Unnamed parasites of the subgenus *Viannia* :

*Leishmania* (V.) sp. Pará State, Brazil : in the sandfly, *Lutzomyia tuberculata*

*Leishmania* (V.) sp. Pará State, Brazil : in an unidentified sandfly, *Psychodopygus* sp.

*Leishmania* (V.) sp. Pará State, Brazil : in the sandfly, *Lutzomyia ubiquitous*.

*Leishmania* (V.) sp. Pará State, Brazil : in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*.

*Leishmania* (V.) sp. Pará State, Brazil : in man.

*Leishmania* (V.) sp. Pará State, Brazil : in man.

Questionable leishmanial parasites :

*Leishmania herreri* Zeledón, Ponce and Murillo, 1979. In the sandflies *Lu. ylephiletor*, *Lu. shannoni* and *Lu. trapidoi*, and the sloths *Choloepus hoffmani* and *Bradypus griseus*.

*Leishmania* sp. (Barbosa *et al.* 1976). From man, Mato Grosso State, Brazil.



rongeurs, canidés, etc.). Le couple hôte/vecteur peut être considéré comme la niche écologique du parasite : une espèce de phlébotome est généralement associée à un hôte principal, entraînant une circulation des parasites en cycle essentiellement «fermé» et jouant donc probablement un rôle important dans la spéciation des leishmanies (LAINSON & SHAW 1987). Ce concept est essentiel dans le cadre d'un travail sur l'éco-épidémiologie car, comme le couple hôte/vecteur s'adapte lui-même à l'environnement [p. ex. par l'intermédiaire de la préférence trophique du vecteur en ce qui concerne les repas de sucre : sur plantes ou aphididés (ANONYME 1990, CAMERON & DAVIES 1993)] et qu'entre vecteurs et leishmanies, il existe des associations spécifiques dont les premières bases moléculaires ont été identifiées au niveau de la LPG [Lipo Phospho Glycan, la molécule la plus répandue sur la surface des leishmanies (PIMENTA *et al.* 1994)], il constitue donc un interface important entre l'environnement et le parasite.

**Comportement.** Les parasites diffèrent également dans leur comportement (i) chez l'insecte, (ii) en culture, (iii) chez l'hôte. Ainsi, (i) chez l'insecte, on retrouve des différences au niveau du développement dans le tube digestif (LAINSON & SHAW 1979). La majorité des leishmanies ont un développement restreint à l'intestin médian et antérieur de l'insecte (groupe Suprapylaria). Cependant, il existe un groupe de leishmanies néo-tropicales, se distinguant par un développement impliquant également l'intestin postérieur (groupe Peripylaria), comme chez les Sauroleishmanies, parasites de reptiles. Si l'on passe (ii) en culture — où le parasite présente une forme semblable à celle de l'insecte —, on retrouve des différences de taux de croissance d'un groupe à l'autre de leishmanies (LAINSON & SHAW 1970). Enfin, (iii) chez leur hôte naturel, on a remarqué que certaines leishmanies sont essentiellement viscérotropiques et d'autres dermatropiques (LAINSON & SHAW 1987).

**Clinique.** La plupart des hôtes des leishmanies sont habitués à ces dernières, et les infections sont inapparentes (LAINSON & SHAW 1987). Par contre, chez les animaux moins habitués, dont l'homme, les infections peuvent engendrer toute une série de pathologies. A cause des différences écologiques entre les leishmanies du Nouveau et de l'Ancien Monde, la place de l'homme dans le cycle est variable. Dans le Nouveau Monde, il constitue généralement un hôte accidentel, car on est en situation de zoonose primaire (SHAW & LAINSON 1987). Dans l'Ancien Monde (cycle sauvage et domestique), on observe une gradation (ASHFORD & BETTINI 1987), depuis l'hôte accidentel (zoonose primaire)

au statut de réservoir principal (anthroponose), en passant par l'hôte secondaire (zoonose secondaire). Probablement à cause de ce spectre épidémiologique, les leishmanies sont plus ou moins bien adaptées à l'environnement que constitue l'homme et peuvent donc présenter des degrés différents d'agressivité vis-à-vis de ce dernier. Ainsi, pour ne parler que des leishmanioses néo-tropicales, on peut faire une première division entre formes tégumentaires indigènes d'une part et viscérales importées par les Conquistadores d'autre part (ces dernières pouvant être mortelles si elles ne sont pas traitées). Ensuite, parmi les leishmanioses tégumentaires, on peut citer différents types par ordre croissant de gravité : lésions cutanées «sèches» à guérison spontanée, lésions «florissantes», lésions disséminées le long des canaux lymphatiques, lésions muqueuses avec sévères mutilations faciales par métastase (*espundia*) (WALTON 1987).

### 1.2.2. Diversité intrinsèque

Une des questions essentielles se posant à ce stade est de savoir s'il existe une base moléculaire à la diversité extrinsèque des leishmanies. Afin de tenter d'y répondre ainsi que de comparer les parasites indépendamment de leurs hôtes/vecteurs, des caractères intrinsèques ont été étudiés. Historiquement, les premières études ont porté sur des caractères non-nucléotidiques, alors que depuis quelques années, on observe une expansion considérable des études portant sur les caractères nucléotidiques.

#### Diversité des caractères moléculaires non-nucléotidiques

Nous ne décrivons pas dans les détails tous les caractères utilisés ; citons seulement les différences observées entre leishmanies, au niveau de leurs antigènes, protéines, lipides, lectines (révisé par SCHNUR 1986). Par contre, nous nous attarderons sur les isoenzymes, car leur analyse constitue la technique de référence pour la caractérisation moléculaire des leishmanies.

Même si elle traite de caractères non nucléotidiques, l'électrophorèse des isoenzymes constitue un outil très puissant, capable de déceler indirectement des différences génétiques de l'ordre d'une paire de bases. En effet, une telle différence au niveau du gène codant pour un enzyme peut (selon la position du nucléotide muté dans le codon) provoquer une variation de la composition en acides aminés de cette protéine, induisant une différence au niveau de son pH isoélectrique, donc une

modification de mobilité électrophorétique. L'utilisation de plusieurs systèmes enzymatiques permet de caractériser chaque isolat par son profil isoenzymatique, c'est-à-dire la liste de ses électromorphes (SERRES & ROUX 1986). Les souches présentant un même profil appartiennent à une population homogène ou zymodème (GODFREY 1979).

Les résultats de l'analyse isoenzymatique des populations naturelles de leishmanies révèlent un polymorphisme de complexité croissante selon le nombre de caractères étudiés. Ainsi, certains loci se sont avérés diagnostiques des grands complexes leishmaniens décrits sur base de caractères extrinsèques (origine géographique, clinique, type de développement chez l'insecte vecteur) : *braziliensis*, *mexicana*, *donovani* (LAINSON & SHAW 1987) et *tropica* (LAINSON & SHAW 1979). Par contre, l'utilisation conjointe de 13 systèmes isoenzymatiques a permis jusqu'à présent l'individualisation de 80 zymodèmes de leishmanies [classification du Centre de Référence de Montpellier (RIOUX *et al.* 1986a, SOCCOL 1993)]. Il est évident que ce nombre peut être revu à la hausse avec la caractérisation de nouveaux stocks ou l'augmentation du nombre de systèmes enzymatiques.

#### Diversité des caractères moléculaires nucléotidiques

L'analyse de cette dernière catégorie de caractères permet d'aborder directement ou indirectement les variations de séquences de l'ADN des parasites, ainsi que de leur organisation. Dans le cas des leishmanies, 2 types d'ADN sont disponibles, l'ADN nucléaire (ADN-n) et l'ADN kinétoplastique (ADN-k). Ce dernier appartient au kinétoplaste, organelle associé au réseau mitochondrial et situé à la base du flagelle de tous les kinétoplastidés (BORST & HOEIJMAKERS 1979). Il est constitué de quelques maxi-cercles et de  $\pm 10\ 000$  mini-cercles d'ADN répétitif. En fonction du type de séquence et du pouvoir de résolution des techniques d'analyse de l'ADN, des différences génétiques ont été mises en évidence entre leishmanies, à des degrés variables.

Premièrement, on a remarqué que des séquences entières avaient divergé entre leishmanies au point de ne plus pouvoir être hybridées de manière croisée. C'est le cas de fragments de mini-cercles, qui ont permis après hybridation [dot-blot, *in situ* (BARKER 1989)] la discrimination de 4 grands complexes de leishmanies définis auparavant.

Deuxièmement, une discrimination plus importante est obtenue si l'on étudie les séquences à un niveau plus fin, avec des techniques à plus haut pouvoir résolutif. Ainsi, des modifications de sites de

restriction (dues à des mutations ponctuelles ou parfois des réarrangements) dans des séquences spécifiques ont permis de discriminer les populations de leishmanies. L'analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) de l'ADN-k a révélé de nombreux schizodèmes (populations caractérisées par des profils de restriction de l'ADN-k similaires, avec diverses enzymes de restriction) (GRIMALDI & TESH 1993). Diverses séquences de l'ADN-n ont également été étudiées par analyse de RFLP, combinée à l'hybridation avec des sondes spécifiques de ces séquences [Beta-tubuline (BEVERLEY *et al.* 1987), séquences intergéniques des gènes ribosomiaux (RAMIREZ & GUEVARA 1987), télomères (ELLIS & CRAMPTON 1988), sondes d'ADN complémentaire (VAN EYS *et al.* 1989)]. Selon le type de séquence utilisée, des degrés divers de variabilité entre leishmanies ont été révélés, allant de différences entre souches (*fingerprinting*) à des différences entre complexes. Dernièrement, des résultats semblables ont été obtenus par amplification PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de segments d'ADN au moyen d'amorces arbitraires [*Random Amplification of Polymorphic DNA* ou RAPD (TIBAYRENC *et al.* 1993)].

Enfin, depuis une dizaine d'années, on assiste au développement du caryotypage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé (SCHWARTZ *et al.* 1983), qui donne accès à un autre niveau d'information génétique. Il a été démontré que la variabilité caryotypique résultait essentiellement de réarrangements chromosomiques, phénomènes survenant à un taux distinct des mutations ponctuelles (WILSON *et al.* 1974). Jusqu'à présent, l'analyse caryotypique du genre *Leishmania* a surtout été effectuée pour étudier l'organisation génomique de diverses séquences et comprendre les mécanismes responsables de la variabilité chromosomique (GALINDO & RAMIREZ 1989, IOVANNISCI & BEVERLEY 1989, PAGES *et al.* 1989). Les rares études extensives effectuées dans un contexte épidémiologique et populationnel ont révélé une grande plasticité génomique chez les leishmanies, ainsi que l'existence de certains caractères conservés (révisé par LIGHTHALL & GIANNINI 1992).

### 1.3. ETUDES ECO-EPIDEMIOLOGIQUES

A l'heure actuelle, l'étude la plus extensive de l'éco-épidémiologie des leishmanioses a été effectuée dans l'Ancien Monde (RIOUX *et al.* 1986b). Cette équipe a développé une méthode originale basée sur l'étude des différents paramètres épidémiologiques le long d'un transect découpé selon une même stratification phyto-écologique (forestière, en

l'occurrence). En effet, d'une part l'insecte vecteur — élément essentiel du cycle — est lié au climat, tout comme la végétation, donc le vecteur est lié à la végétation. D'autre part, le vecteur est lié au réservoir, et celui-ci est donc aussi lié au climat et à la végétation. Le postulat que l'on retrouve derrière ces syllogismes est que la végétation peut être considérée comme un indicateur permanent du cycle complet de la leishmaniose. Ce postulat a été vérifié dans plusieurs foyers. Dans le cas de la leishmaniose viscérale de la région de Montpellier par exemple, 5 strates ont été utilisées : l'étape halophile, la chênaie d'yeuse, la chênaie mixte, la chênaie caducifoliée et la hêtraie. L'enquête éco-épidémiologique a confirmé que la densité maximale des phlébotomes vecteurs et du réservoir (le chien) était observée aux mêmes étages (la chênaie mixte et la chênaie d'yeuse). L'application immédiate de ce type d'études est de pouvoir délimiter simplement la zone à risque d'une leishmaniose dans un foyer et de l'extrapoler à d'autres foyers écologiquement semblables.

## 2. Eco-épidémiologie descriptive des Leishmanioses péruviennes

### 2.1. ECOLOGIE DU PÉROU

#### 2.1.1. Géographie

Trois éléments essentiels caractérisent géographiquement le Pérou (fig. 1) : les Andes et l'océan Pacifique, tous deux à l'origine de nombreuses barrières géographiques, et la forêt amazonienne, qui contribue quant à elle à une certaine continuité. Premièrement, la Cordillère andine traverse le pays du Nord au Sud, et le sépare en deux régions, la frange côtière et la forêt amazonienne. Culminant sur presque la totalité de sa longueur à une altitude supérieure à 4 000 mètres, la Cordillère constitue une barrière quasi infranchissable pour la plupart des espèces animales ; un seul endroit de passage existe dans le Nord (passe de Porculla, 2 700 m). De plus, elle descend en se ramifiant vers les plaines et y constitue une succession de vallées fortement isolées les unes des autres. Deuxièmement, l'océan Pacifique délimite la frontière occidentale du pays et a une influence essentielle sur le climat côtier. En hiver, les alizés se chargent d'humidité au contact du courant (froid) de Humboldt et forment des stratus qui ne peuvent se condenser à cause d'une inversion thermique ; par contre, en été, les alizés faiblissent et les stratus disparaissent : ceci explique l'existence sur la côte de nombreux déserts, barrières géographiques additionnelles. Troisièmement, la forêt amazonienne s'étend sur toute la partie orientale des Andes et remonte à l'intérieur de leurs vallées jusqu'à une altitude de 1 000 m : la forêt constitue un élément de relative continuité avec de nombreux pays sud-américains, puisqu'elle appartient à un même bassin hydrographique.

#### 2.1.2. Unités bio-géographiques

Le Pérou n'est pas seulement partagé par des barrières géographiques, mais il présente également des caractéristiques écologiques fort variables. Un premier niveau d'analyse de cette complexité fait apparaître 8 régions naturelles définies par leur altitude [tableau 2 (GUERRA 1988)]. Un deuxième niveau d'analyse montre que ces régions sont elles-mêmes écologiquement structurées. Ainsi, en se basant sur l'endémisme de

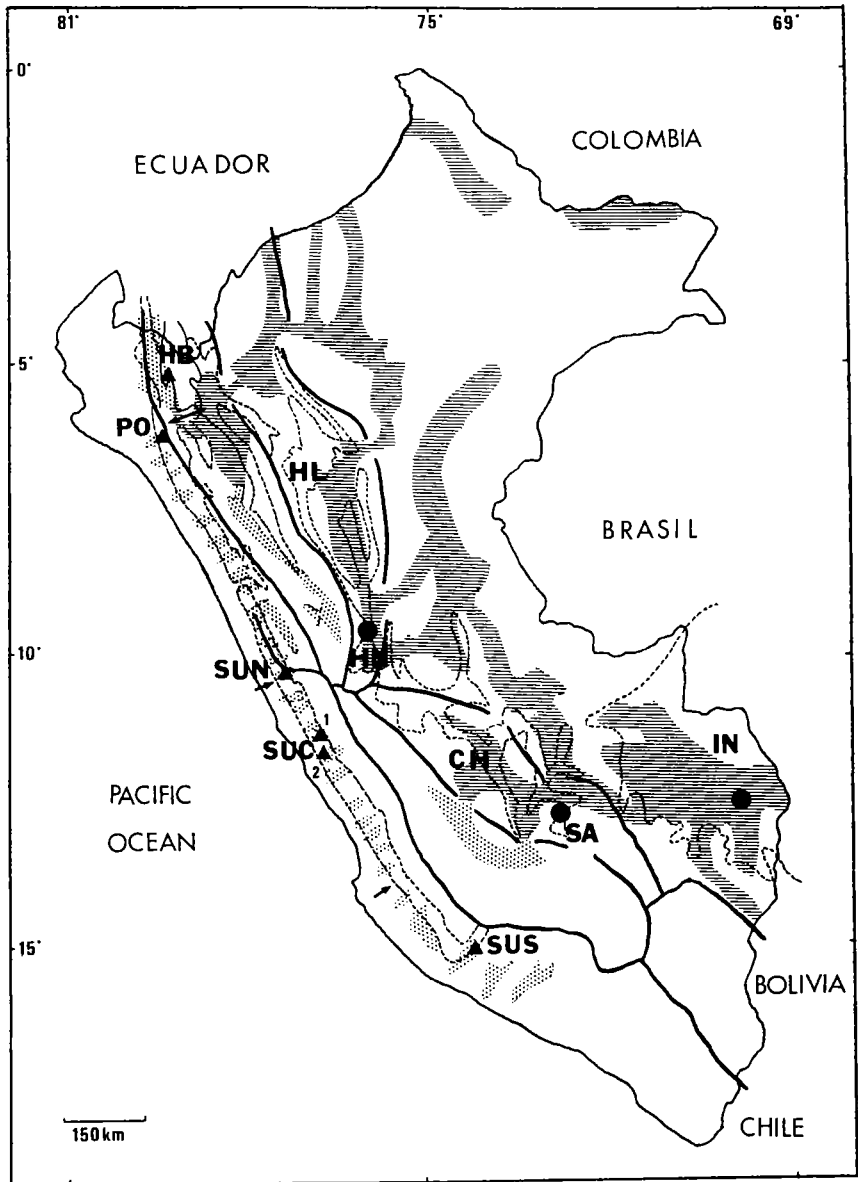


Fig. 1. — Carte du Pérou montrant l'origine bio-géographique des stocks péruviens utilisés dans cette étude (uta : zones d'endémisme ombrées par de petits points ; foyers étudiés, ▲. Leishmaniose sylvatique : zones d'endémisme hachurées ; foyers étudiés, ●) et les principales montagnes (lignes épaisses). Les dix unités bio-géographiques (selon LAMAS 1982) caractérisant les foyers sont entourées d'un pointillé et séparées par une flèche dans le cas des 3 unités de Surco. CH, Chanchamayo ; HB, Huancabamba (foyer de Huancabamba) ; HL, Huallaga ; HN, Huanuco ; IN, Inambari ; PO, Porculla ; SA, Santa Ana ; SUN, Surco-Nord (foyer de Huayllacayan) ; SUC, Surco-Centre (foyers de Canta, 1 et Santa Eulalia, 2) ; SUS, Surco-Sud (foyer de Lucanas). La double flèche indique la localisation de la passe de Porculla.

**Tableau 2**

Description des 8 régions naturelles du Pérou

Région naturelle	Altitude (m)	Caractéristiques	Leishmaniose
Chala	0-500	Désert côtier	-
Yunga	500-2 300	Pente ouest des Andes Xérophyte	+
Quechua	2 300-3 500	Région tempérée	+
Suni	3 500-4 100	Région froide, très accidentée	-
Puna	4 100-4 800	Hauts plateaux	-
Janca	> 4 800	Neiges éternelles, quasi pas de vie végétale ni animale	-
Rupa-Rupa	400-1 000	Pente est des Andes Haute jungle	+
Omagua	80-400	Forêt tropicale humide	+

différentes espèces de papillons (inféodées à des végétaux différents), un entomologiste péruvien a décrit 48 unités bio-géographiques (BGU), reflétant des différences écologiques plus fines et les barrières géographiques existant au Pérou (LAMAS 1982). Ces BGU semblent valides pour d'autres espèces animales [mammifères, oiseaux,... (LAMAS, communication personnelle)]. Elles constituent donc une référence essentielle pour tous les travaux liés à l'écologie du Pérou et, à ce titre, nous avons utilisé tout au long de ce mémoire les 10 BGU suivantes, qui couvrent une grande partie du territoire d'endémisme de la leishmaniose péruvienne.

#### BGU sylvatiques

Inambari : forêt de basses terres, 0-500 m, en communication avec le Brésil et la Bolivie.

Chanchamayo et Huallaga : forêt de basse montagne, 500-1 500 m.

Huancabamba : forêt de haute montagne, 1 500-3 500 m, tout près de la passe de Porculla.

#### BGU non sylvatiques

Porculla : montagne basse ouverte, 1 000-2 700 m, passe entre la côte et la forêt.



Santa Ana et Huanuco : montagne basse ouverte, 500-2 000 m.

Surco : montagne basse ouverte, 1 000-2 700 m ; subdivisée respectivement en Surco-Nord, Centre et Sud par le Río Fortaleza et le désert d'Ica.

## 2.2. EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSES PERUVIENNES

### 2.2.1. Clinique

Les leishmanioses péruviennes sont dans leur presque totalité de type cutané. Deux formes ont principalement été décrites sur des bases clinico-géographiques : la leishmaniose sylvatique et andine (uta).

La forme sylvatique est endémique dans la forêt amazonienne jusqu'aux premiers contreforts des Andes (GUERRA 1988). Elle commence par de sévères lésions cutanées (fig. 2a) au site d'inoculation, qui peuvent dans à peu près 10 % des cas (LLANOS-CUENTAS 1991) engendrer des métastases vers les muqueuses de la bouche et du nez (espundia), et y provoquer d'atroces mutilations (fig. 2b).

La forme andine est endémique entre 600 et 3 000 m dans les vallées andines (essentiellement sur le piémont Pacifique) et interandines. Elle se caractérise par des lésions cutanées moins sévères (fig. 2c) que dans la forêt, et — particularité essentielle — ces lésions n'évoluent jamais vers un espundia [sur plus de 1 000 cas suivis jusqu'à présent (LLANOS-CUENTAS, communication personnelle)]. A l'intérieur de la leishmaniose andine, on retrouve — à un degré moindre — des différences cliniques, comme le montre une étude (LLANOS-CUENTAS & DAVIES, communication personnelle) effectuée en parallèle à ce travail chez 506 patients originaires de différents foyers à uta. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons procédé à une nouvelle lecture de ces résultats sur base des BGU d'origine des patients (Huancabamba, Surco-Nord et Surco-Centre). Six paramètres ont été mesurés : (1) type de pathologie (cutanée ou muco-cutanée) ; (2) âge des lésions ; (3) nombre de lésions ; (4) localisation (face, membres, tronc) ; (5) type de lésion (ulcère ou nodule) ; ainsi que (6) leur taille. Pour effectuer les tests statistiques, les patients de Huancabamba (BGU sylvatique située près de la passe de Porculla) ont été comparés à ceux provenant de Surco-Nord et Surco-Sud (toutes deux BGU non sylvatiques et situées au Sud de Huancabamba). Comme le montre le tableau 3, les tests se sont montrés significatifs pour les paramètres 3, 4 et 6. En d'autres mots, dans les 3 BGU, (i) la pathologie est essentiellement cutanée, avec de rares cas

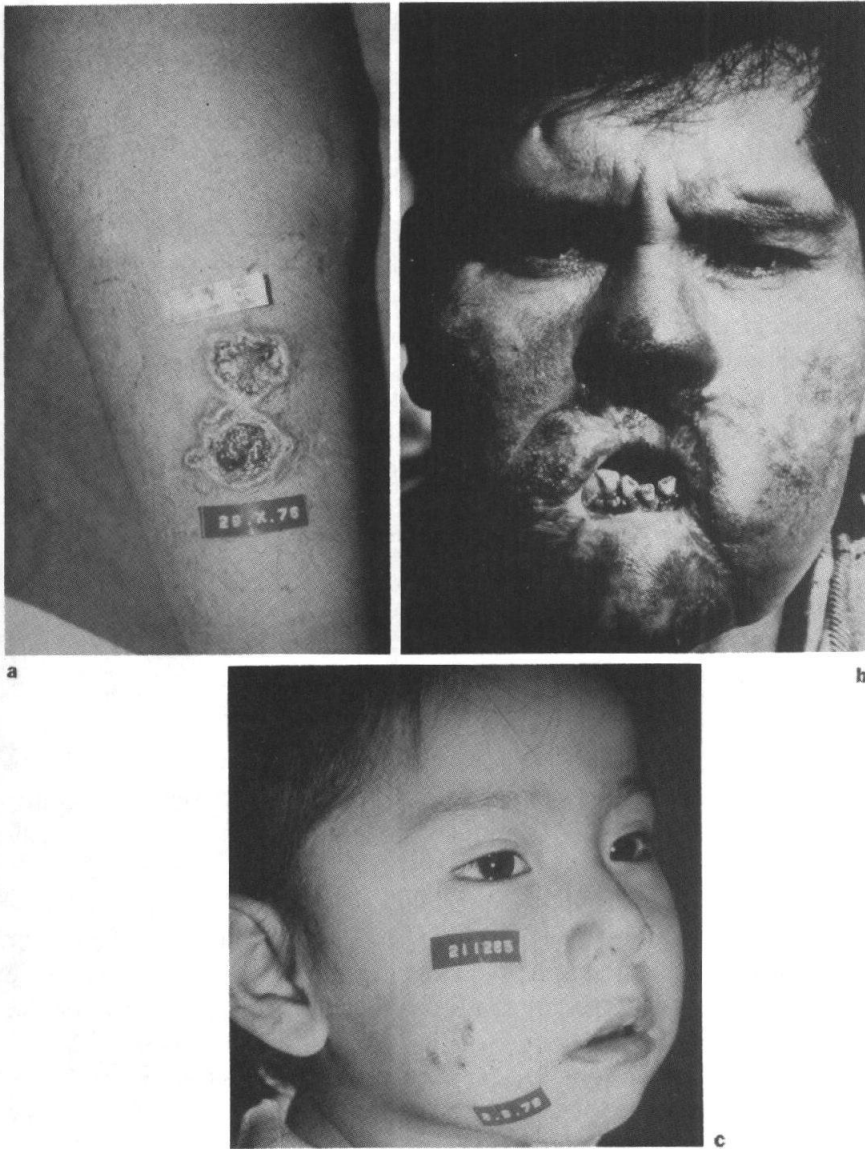


Fig. 2. — Formes cliniques rencontrées dans les leishmanioses péruviennes : lésion cutanée sylvatique (a) ; métastase muqueuse ou espundia (b) ; lésion cutanée andine ou uta (c) (Photos : A. Llanos - Cuentas).

de lésions muqueuses probablement par contiguïté, (ii) les lésions n'ont pas un âge différent et (iii) elles sont essentiellement de type ulcératif. Cependant, les patients de Huancabamba ont des lésions plus grandes (donc plus semblables aux lésions primaires observées dans la forêt) et plus nombreuses que les patients des 2 autres BGU. De plus, dans la BGU septentrionale, la plupart des lésions se retrouvent sur les membres. Les différences de localisation et de nombre de lésions (si elles sont dispersées sur le corps) reflètent probablement le comportement du vecteur et/ou de l'hôte. Par contre, le nombre de lésions (si elles sont concentrées) et leur taille pourraient être liés au type de parasite circulant dans les BGU respectives et/ou à des différences immunogénétiques entre hôtes.

D'un point de vue épidémiologique, les deux leishmanioses sont fort différentes également. La leishmaniose sylvatique touche essentiellement les adultes (GUERRA 1988), ce qui suggère une transmission primaire (zoonose) où seules certaines catégories à risque s'infectent lors d'activités les menant dans la forêt (chasse, prospection pétrolière, culture de la coca, ...). Par contre, la leishmaniose andine touche toutes les classes d'âge : dans certains villages plus de 90 % de la population a eu un épisode de leishmaniose dans sa jeunesse (LUMBRERAS & GUERRA 1985). Ceci suggère une transmission de type secondaire (anthropozoonose).

### 2.2.2. Vecteurs et réservoirs

L'étude des vecteurs et réservoirs probables de leishmanies constitue un élément essentiel à la compréhension de l'épidémiologie des leishmanioses péruviennes.

Tout d'abord, les données disponibles confirment le type de transmission dans la forêt et les Andes. D'une part, dans la forêt, on trouve de nombreuses espèces de phlébotomes : plus de 26 dans une seule localité (PEREZ *et al.* 1990). Tous les vecteurs incriminés [*Lutzomyia olmeca*, *Lu. anduzei*, *Lu. gomezi*, *Lu. umbratilis*, *Lu. longipalpis*, *Lu. panamensis* (GUERRA 1988)] ont été rencontrés en situation primaire. On pense que le réservoir pourrait être constitué de paresseux et de rongeurs (LUMBRERAS & GUERRA 1985). Ces données confirment donc la nature zoonotique de la transmission de la leishmaniose dans la forêt. D'autre part, dans les Andes, le nombre d'espèces de phlébotomes est plus restreint. Trois espèces ont été prouvées comme vecteurs : *Lu. peruensis* (PEREZ *et al.* 1991, VILLASECA *et al.* 1993), *Lu. verrucarum*

**Tableau 3**

Caractères cliniques étudiés : fréquence des patients (1, 3-5),  
distribution des valeurs (2,6).

Lésion par contiguïté<sup>a</sup>.

Test statistique : chi-carré, T de Student<sup>b</sup> ou Kruskal-Wallis H<sup>c</sup>

Paramètre clinique	HB	SUN	SUC	valeur-p
<b>1. Type de pathologie</b>				
Cutanée	270	115	110	0,146
Muqueuse <sup>a</sup>	3	5	3	
<b>2. Age des lésions (mois)</b>				
Nombre de patients	261	117	113	0,765 <sup>c</sup>
percentile 25	2	2	1	
médiane	3	3	3	
percentile 75	6	5	7	
maximum	38	36	36	
<b>3. Nombre de lésions</b>				
1	110	62	68	< 0,005
> 2	162	57	44	
<b>4. Localisation des lésions</b>				
Face	64	79	61	< 0,005
Membres	140	27	38	
Tronc	9	0	2	
<b>5. Type de lésion</b>				
ulcérateive	177	73	57	0,228
nodulaire	21	11	13	
<b>6. Taille des lésions</b>		SUN + SUC		
a. analyse par lésion				< 0,005 <sup>b</sup>
nombre	616	405		
moyenne	3,112	2,479		
variance	11,293	12,876		
b. analyse par patient (moyenne de ses lésions)				< 0,005 <sup>c</sup>
nombre	262	230		
percentile 25	1,600	1,000		
médiane	2,535	1,925		
percentile 75	3,900	2,650		
maximum	24,100	53,800		

(DAVIES *et al.* 1993) et *Lu. ayacuchensis* (CACERES *et al.* 1991, DUJARDIN *et al.* 1993b), et leur comportement semble tout à fait opposé à celui des vecteurs de la forêt, puisqu'on les retrouve en situations intradomiciliaire et péri-domiciliaire. Diverses données suggèrent le rôle du chien comme possible réservoir de leishmanies (LLANOS-CUENTAS & DAVIES 1992) et appuient l'hypothèse d'une transmission anthroponotique de la transmission de la leishmaniose en région andine. Cependant, on ne peut exclure que, par endroits, la transmission soit anthroponotique.

Comme pour la clinique, la lecture éco-géographique des données vectorielles apporte des informations essentielles. En effet, la distribution des vecteurs andins (prouvés ou soupçonnés) révèle des différences d'endémisme d'une BGU à l'autre : on retrouve respectivement à Huancabamba une espèce jumelle de *Lu. ayacuchensis* (soupçonnée vectrice), à Surco-Nord et Surco-Centre, les 2 espèces *Lu. peruensis* et *Lu. verrucarum* en sympatrie, et à Surco-Sud l'autre espèce jumelle de *Lu. ayacuchensis*.

Enfin, malgré ces différences, les phlébotomes sylvatiques et andins présentent certaines caractéristiques en commun : (i) leur pic d'activité s'étale entre 18h et 23h (ce qui explique pourquoi, en situation sylvatique, les catégories humaines à risque sont liées à des activités nocturnes) ; et (ii) à cause de leur très faible capacité de vol, leur aire d'activité est très limitée (quelques centaines de mètres). Cette dernière caractéristique est d'ailleurs utilisée en forêt pour le contrôle de la leishmaniose (déforestation autour du village).

### 2.2.3. Parasites

La responsabilité des deux formes cliniques décrites précédemment a été attribuée à deux espèces de leishmanies, *L. (V.) braziliensis* (leishmaniose sylvatique) et *L. (V.) peruviana* (uta) appartenant toutes deux au complexe *braziliensis* (LUMBRERAS & GUERRA 1985). Longtemps, cette subdivision en deux espèces a été basée uniquement sur des critères clinico-géographiques. Lors de l'introduction des caractères intrinsèques, on s'est rendu compte que les deux parasites étaient en fait génétiquement très semblables (ARANA *et al.* 1990, GUERRINI 1993, BANULS 1993) : un locus seulement sur 17 permet de les distinguer [alors que par exemple *L. braziliensis* et *L. guyanensis*, une autre espèce du complexe *braziliensis*, se distinguent par 6 loci (GUERRINI 1993)]. Le cas de *L. braziliensis* et *L. peruviana* illustre deux des problèmes

essentiels rencontrés par les «leishmaniaques» : (i) quels critères utiliser pour considérer que 2 parasites appartiennent à 2 espèces différentes? et (ii) comment deux parasites si semblables génétiquement peuvent être responsables de formes cliniques si différentes? Cette dernière question fait partie des problèmes abordés dans ce travail.



### 3. Eco-épidémiologie fonctionnelle des Leishmanioses péruviennes

#### 3.1. OBJECTIFS

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que des différences cliniques et vectorielles étaient corrélées à des différences environnementales naturelles (forêt-Andes et différentes BGU dans les Andes, tableau 4) et artificielles (degré d'anthropisation). Dans le cadre d'une étude sur l'éco-épidémiologie, la question est de savoir quel(s) élément(s) pourrai(en)t jouer le rôle de la courroie de transmission entre l'environnement et la clinique. La nature du cycle pourrait contribuer à expliquer les différences cliniques observées entre les Andes et la forêt. En effet, dans la forêt, le cycle est sylvatique et donc les leishmanies ne sont pas adaptées à l'homme (et vice versa), lui infligeant ainsi une pathologie grave. Par contre, dans les Andes, le cycle présente une tendance à la domestication, donc le parasite est mieux adapté à l'homme (et vice versa), avec pour résultat une pathologie moins grave. Reste à déterminer le rôle respectif du parasite et de l'hôte dans cette association : deux hypothèses qui ne sont pas mutuellement exclusives peuvent être formulées à ce sujet (tableau 4). D'une part, l'hypothèse «hôte» revient à dire que des populations humaines génétiquement et/ou immunologiquement différentes vivaient dans les régions éco-géographiques. D'autre part, l'hypothèse «parasite» suggère que (i) des populations de parasites génétiquement différents auraient colonisé les différents vecteurs (eux-mêmes adaptés aux différentes régions éco-géographiques) ; et que (ii) des différences génétiques seraient responsables d'une virulence variable. Dans le cadre de ce travail, c'est cette deuxième hypothèse que nous avons choisi de tester.

#### 3.2. ETUDE GENETIQUE DES PARASITES

Afin de répondre aux deux questions posées par l'hypothèse «parasite» (1. existence de différentes populations génétiques de *L. peruviana* et *L. braziliensis* en fonction de différences environnementales ; 2. leur rôle éventuel dans des différences de virulence), il était impératif d'analyser des caractères génétiques capables de discriminer les leish-



Tableau 4

Eco-épidémiologie des leishmanioses péruviennes ; liens fonctionnels identifiés au début de ce travail (→) et considérés comme objectifs de ce travail (- - - →) ; informations non disponibles (-N-).

		ANDES			
		HB	SUN	SUC	SUS
FORET					
BGU	-N-				
Vecteur	SYLVATIQUE	DOMESTIQUE? → <i>Lu. ayacuchensis?</i>	DOMESTIQUE? → <i>Lu. peruensis</i> <i>Lu. verrucanum</i>	DOMESTIQUE → <i>Lu. ayacuchensis</i>	DOMESTIQUE?
Parasite	<i>L. braziliensis</i>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <b>HYPOTHESE "PARASITE"</b> </div>			
Clinique	LESIONS SEVERES ESPUNDIA (10%)	<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruviana</i>
		PAS D'ESPUNDIA ↓ grandes lésions	PAS D'ESPUNDIA ↓ petites lésions	PAS D'ESPUNDIA ↓ petites lésions	PAS D'ESPUNDIA ↓ -N-
Homme	-N-	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> <b>HYPOTHESE "HOTE"</b> </div>			
		-N-	-N-	-N-	-N-

manies jusqu'à un niveau infraspécifique, et ayant une signification fonctionnelle potentielle.

### 3.2.1. *Choix des caractères étudiés*

Les caractères génétiques les plus utilisés pour appréhender la diversité intrinsèque des leishmanies (isoenzymes, RFLP) reflètent essentiellement des variations de séquence nucléotidique par mutation ponctuelle et présentent des taux de variation fortement corrélés (TIBAYRENC & AYALA 1987). Les caractères de ce type permirent à peine la distinction entre *L. braziliensis* et *L. peruviana*, et ne semblent pas les plus appropriés pour mettre en évidence des différences génétiques infraspécifiques (si elles existent). Nous avons donc cherché à étudier d'autres types de caractères. Dans ce contexte, les travaux de WILSON *et al.* (1974) ont été très précieux. En effet, cet auteur a montré chez les mammifères que le taux de macromutation par réarrangements chromosomiques était différent du taux de mutation ponctuelle. D'après cet auteur, ce seraient ces réarrangements plutôt que les mutations ponctuelles qui seraient le moteur de l'évolution organique. De plus, selon MACGREGOR (1982), le caryotype serait le produit d'une sélection pour l'arrangement des gènes, la taille et le nombre de chromosomes, constituant ainsi un moyen d'atteindre un phénotype adaptatif. Par conséquent, l'étude de la variabilité génomique pourrait apporter d'autres réponses aux questions posées par la diversité extrinsèque des leishmanies que l'étude de la variabilité des séquences nucléotidiques. C'est donc sur les caractères caryotypiques que nous avons porté notre choix, tout en étudiant en parallèle des caractères isoenzymatiques pour avoir un cadre de référence.

### 3.2.2. *Développement des outils nécessaires à l'étude de la variabilité caryotypique (\*)*

L'étude du caryotype des Trypanosomatidés est impossible par les méthodes traditionnelles de cytogénétique car, durant la mitose, les chromosomes ne se condensent pas de manière à pouvoir être visualisés en microscopie photonique (VAN DER PLOEG *et al.* 1984). Il faut donc

(\*) Toutes les techniques de génétique moléculaire hormis le PFG sont des techniques classiques (SAMBROOK *et al.* 1989) que nous avons jugé bon de ne pas détailler ici.

avoir recours à une approche alternative, offerte par le développement de l'électrophorèse en champ pulsé [Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis ou PFG (SCHWARTZ *et al.* 1983)]. Cette méthode permet de séparer en gel d'agarose des molécules d'ADN atteignant une taille de 3 000 kilobases (alors que les électrophorèses conventionnelles étaient limitées à 50 kb), grâce à deux principes : (i) l'utilisation de 2 champs électriques perpendiculaires et inhomogènes (afin de permettre l'étirement des longues molécules d'ADN, nécessaire à leur migration à travers le réseau d'agarose) ; et (ii) l'activation alternée de ces deux champs (permettant une séparation des molécules selon leur taille à cause du temps de contraction nécessaire à leur migration dans une direction perpendiculaire). Cette technique a été introduite dans notre laboratoire en 1987, et ses paramètres optimisés depuis (Annexe I). Elle permet en trois électrophorèses la résolution du caryotype moléculaire d'une leishmanie.

#### a. Caractérisation du caryotype leishmanien

L'analyse par PFG montre chez la leishmanie un caryotype moléculaire composé d'une vingtaine de bandes électrophorétiques (colorées au bromure d'éthidium) dont la taille varie entre 250 et 1 900 kb (fig. 3). L'analyse densitométrique des ces bandes montre que certaines contiennent plus d'ADN que d'autres : une bande électrophorétique peut donc être constituée de plusieurs chromosomes co-migrants. Le nombre total de chromosomes a été estimé à 96 (GALINDO & RAMIREZ 1989). La taille de la majorité des chromosomes est stable en cours d'entretien *in vivo* ou *in vitro*, et quand des variations sont observées, elles sont toujours très faibles (< 5 % de la longueur du chromosome).

#### b. Analyse numérique des données caryotypiques

L'analyse compréhensive de la variabilité caryotypique — essentiellement afin de pouvoir classer des isolats selon leur similarité caryotypique — requiert un traitement numérique des nombreuses données. L'approche classique de ce genre de problème consiste à relever tous les caractères présents dans un groupe d'organismes (ici, la taille de chromosomes), puis de pointer pour chaque organisme les caractères présents et absents par un 1 et un 0 respectivement (encodage disjonctif). La matrice ainsi obtenue peut alors être utilisée pour calculer différentes distances génétiques (SERRES & ROUX 1986). Cependant, l'encodage disjonctif est incompatible avec l'analyse numérique de la variabilité caryotypique, car il générerait un caractère distinct pour toutes les

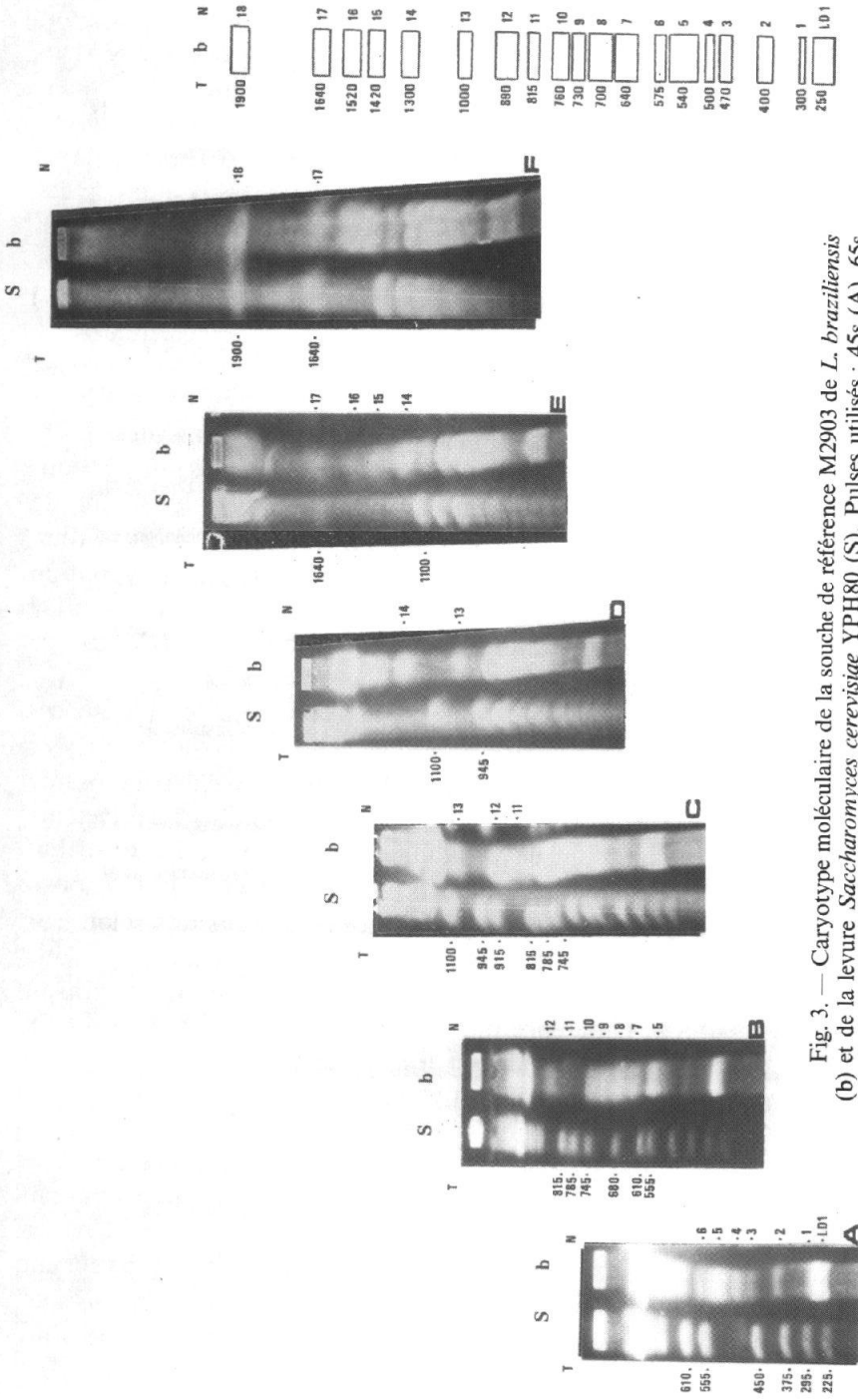


Fig. 3. — Caryotype moléculaire de la souche de référence M2903 de *L. braziliensis* (b) et de la levure *Saccharomyces cerevisiae* YPH80 (S). Pulses utilisés : 45s (A), 65s (B), 90s (C), 115s (D), 130s (E) et 145s (F). Coloration au bromure d'éthidium ; taille en kb (T) ; numéro des bandes chromosomiques de M2903 (N).

variations de taille, en attribuant le même poids à chacune d'elles. Or, dans certains cas, les variations sont mineures et peuvent être dues à des artefacts techniques (inhomogénéité des champs électriques, quantité d'ADN chargé) (LAI *et al.* 1989) ou à des amplifications/délétions dans les télomères (BERNARDS *et al.* 1983). Dans d'autres cas par contre, les variations sont plus significatives et dues à des réarrangements chromosomiques (LIGHTHALL & GIANNINI 1992, IOVANNISCI & BEVERLEY 1989). La compréhension du polymorphisme caryotypique requiert impérativement la distinction entre ce bruit de fond et les variations de taille plus significatives.

Une première approche de ce problème a été permise par l'analyse statistique de la distribution de taille des chromosomes, qui révèle un ou plusieurs modes de distribution normale (voir exemple fig. 7). De cette analyse, nous avons déduit deux critères essentiels utilisés tout au long de ce travail (DUJARDIN *et al.* 1993a) : (i) le critère de conservation de taille (coefficient de variation de taille à l'intérieur d'un mode  $< 5\%$ , c'est-à-dire de même ordre de grandeur que la variation observée pour certains chromosomes en cours d'entretien), et (ii) le critère de spécificité de taille (taille moyenne unique pour le groupe d'organismes étudiés).

Dans la seconde approche, nous avons considéré les différences absolues de taille entre chromosomes. Deux méthodes se sont basées sur ce type de données. Premièrement, l'analyse en composante principale (SERRES & ROUX 1986) qui cherche à identifier les 2 facteurs responsables du maximum de variabilité, les traduit en 2 axes orthogonaux et construit un diagramme où les différents isolats se positionnent par rapport à ces axes et forment des agglomérats selon leur similarité caryotypique (voir exemple fig. 8). Deuxièmement, une méthode originale d'analyse phénétique développée durant ce travail (Chromosomal Size Difference Index ou CSDI, DUJARDIN *et al.* 1995). Cette méthode permet de visualiser les similarités sous la forme d'un dendrogramme (voir exemple fig. 10).

### c. Analyse du caryotype de position

La variabilité caryotypique peut être analysée à un premier niveau en comparant la taille des bandes chromosomiques chez différentes leishmanies (fig. 4). Ceci a été effectué sur des leishmanies appartenant aux 2 principaux complexes d'espèces néotropicales (*braziliensis* et *mexicana*) et a montré que le caryotype considéré en entier varie d'un

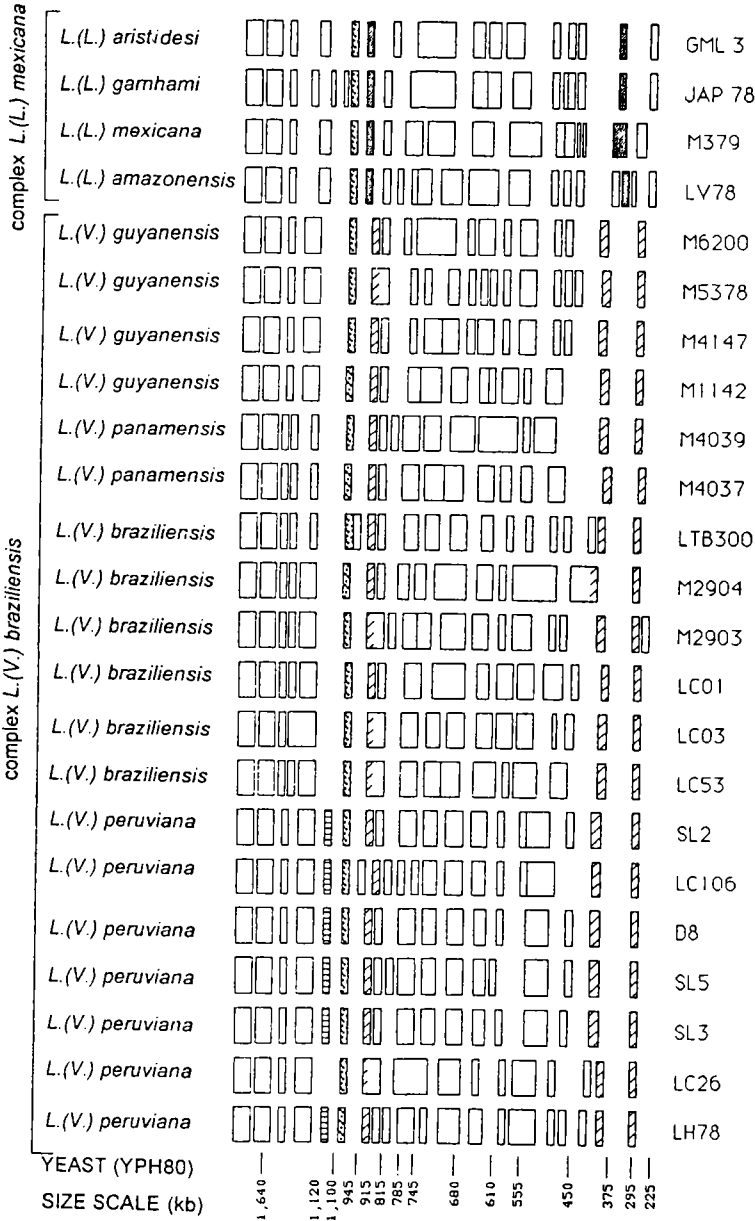


Fig. 4. — Caryotype moléculaire de *Leishmania* néotropicales obtenu à partir de gels PFG colorés au bromure d'éthidium. La taille des bandes varie de 250 à plus de 1,640 kb d'après une estimation faite à partir d'une échelle de *Saccharomyces cerevisiae*. L'échelle de taille n'est pas linéaire, car les migrations sont effectuées à 3 pulses différents, mais la position relative de chaque bande est respectée. Les bandes plus grosses correspondent à une intensité de fluorescence plus grande. Des bandes de taille conservée (coefficient de variation < 5 %) sont observées à 1,000 kb (▨) pour toutes les *Leishmania*, 295, 405 et 900 (▤) dans le complexe *braziliensis*, et 350 et 930 kb (▧) dans le complexe *mexicana* (d'après DUJARDIN *et al.* 1993a).

isolat à l'autre (DUJARDIN *et al.* 1993a). Cependant, en utilisant le critère de conservation et de spécificité de taille décrit plus haut, nous avons observé :

- une bande conservée de 1 000 kb à travers les deux complexes ;
- plusieurs bandes spécifiques de chaque complexe.

A ce stade-ci, notre outil est donc encore loin de pouvoir permettre une discrimination spécifique et infraspécifique. Une des raisons est le caractère relativement biaisé de l'analyse du caryotype de position, puisqu'on n'a aucune information sur le contenu génétique des bandes comparées ni sur leur similarité de séquences. C'est pourquoi il était nécessaire de passer à un deuxième niveau d'analyse, où l'on utiliserait comme caractère la taille des chromosomes et non plus celle des bandes chromosomiques. Pour ce faire, des sondes d'hybridation reconnaissant les chromosomes étaient nécessaires.

#### d. Analyse du caryotype d'hybridation

Dans cette deuxième étape, après électrophorèse PFG, les chromosomes sont transférés du gel d'agarose où ils ont été résolus vers une membrane de nylon où ils seront fixés, puis hybridés avec une sonde appropriée. Les caractères étudiés sont donc la taille des chromosomes reconnus par ces sondes, et le même critère de conservation et de spécificité est utilisé pour cette seconde approche.

Les premières sondes que nous avons utilisées correspondaient à des gènes constitutifs comme ceux de la beta- et de l'alpha-tubuline (fig. 5). Le type de patrons obtenus permet la discrimination des complexes *braziliensis* et *mexicana*, mais ne montre pas de variabilité à des niveaux hiérarchiques inférieurs. Afin d'évaluer si une discrimination était possible à ces niveaux, d'autres sondes reconnaissant des chromosomes variables étaient nécessaires. Nous avons développé nous-mêmes ces propres sondes en utilisant la stratégie suivante. Premièrement, nous avons sélectionné dans le caryotype total des bandes non conservées au sein du complexe *braziliensis*. Deuxièmement, nous avons hybridé ces bandes chromosomiques sur le caryotype de différentes leishmanies de ce complexe et sélectionné celles qui révélaient un patron d'hybridation polymorphe chez différentes espèces. Troisièmement, ces sondes ont été utilisées pour isoler divers clones ADN d'une librairie génomique de *L. braziliensis*. Enfin, ces clones (censés révéler un polymorphisme d'hybridation similaire à celui obtenu avec les bandes chromosomiques utilisées pour leur sélection) ont été utilisés comme sondes recombinantes

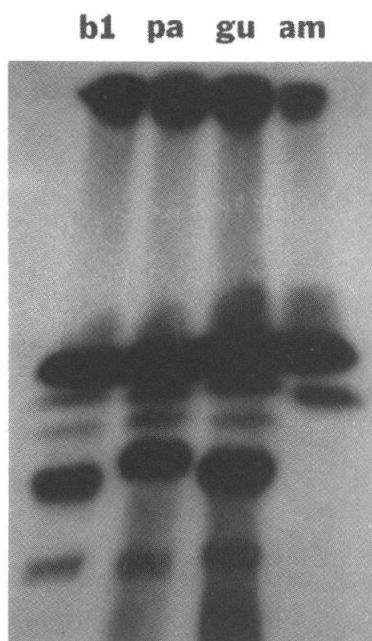


Fig. 5. — Polymorphisme de taille chromosomique entre les complexes *braziliensis* et *mexicana* après hybridation avec une sonde  $\beta$ -tubuline. Stocks : b1, *L. (V.) braziliensis* M2904 ; pa, *L. (V.) panamensis* M4037 ; gu, *L. (V.) guyanensis* M4147 ; am, *L. (L.) amazonensis*.

pour analyser la variabilité caryotypique dans le complexe *braziliensis*. Quatre clones reconnaissant des chromosomes de taille différant par espèce ou groupe d'organismes ont ainsi été sélectionnés : pLb-22 (fig. 6a), pLb-134Sg (fig. 6b), pLb-134Sp (fig. 6b) et pLb-168Sg (fig. 6c) (DUJARDIN *et al.* 1993a). Ce sont ces clones qui ont été utilisés pour l'étude caryotypique des populations naturelles de *L. braziliensis* et *L. peruviana*.

### 3.3. ANALYSE GENETIQUE DES POPULATIONS NATURELLES DE *L. BRAZILIENSIS* ET *L. PERUVIANA*

Un total de 56 stocks parasites ont été étudiés (annexe 2) : 11 caractérisés isoenzymatiquement comme *L. braziliensis* et 45 comme *L. peruviana*. Dans le contexte de cette étude éco-épidémiologique, les BGU de Lamas ont été utilisées pour sélectionner les foyers



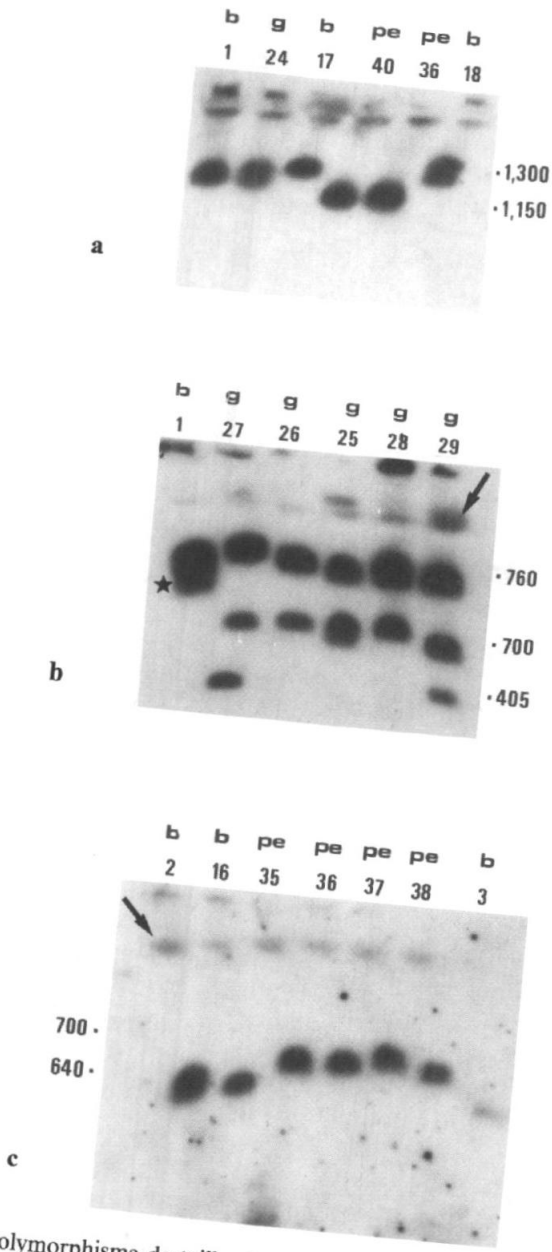


Fig. 6. — Polymorphisme de taille chromosomique dans le complexe *braziliensis* après hybridation avec les sondes pLb-22 (a), pLb-134Sg (plus grand chromosome) et pLb-134Sp (plus petit chromosome) (b) et pLb-168Sg (c). Taille en kb ; flèche : hybridation avec la masse de chromosomes non résolus. Stocks : **b**, *L. braziliensis* (M2903, 1 ; M2904, 2 ; LTB300, 3 ; LC01,16 ; LC03, 17) ; **g**, *L. guyanensis* (M5378, 24 ; M4147, 25 ; WAR, 26 ; KLEI, 27 ; LEM669, 28 ; CAYH166, 29) ; **pe**, *L. peruviana* (SL2, 35 ; SL3, 36 ; SL5, 37 ; D8, 38 ; LC106, 40). D'après DUJARDIN *et al.* 1993a.

d'échantillonnage (chacun ayant un diamètre inférieur à 25 km). Les stocks de *L. braziliensis* provenaient de 3 foyers sylvatiques péruviens correspondant à 5 BGU (Huallaga/Huanuco, Chanchamayo/Santa Ana et Inambari) ainsi que du Brésil et de la Bolivie. Les stocks de *L. peruviana* étaient originaires de 4 foyers andins correspondant à 4 BGU (Huancabamba, Surco-Nord, Surco-Centre et Surco-Sud). Ces stocks ont été étudiés sans être clonés, afin qu'ils soient les plus représentatifs des populations circulantes. Etant donné que ce matériel non cloné était destiné à la caractérisation par différentes méthodes (caryotypage et analyse des isoenzymes), et afin d'éviter des variations populationnelles, le matériel a été produit en un seul lot et préparé ensuite selon les besoins spécifiques de chaque méthode (annexe 3).

### 3.3.1. Discrimination caryotypique de *L. braziliensis* et *L. peruviana*

Sur les 4 chromosomes étudiés, un seul a permis une discrimination des deux espèces (DUJARDIN *et al.* 1993b). La taille du chromosome pLb-134Sp a présenté une valeur de  $697 \pm 24$  kb (95 % de la distribution) pour *L. braziliensis* et de  $610 \pm 46$  kb (95 % de la distribution) pour *L. peruviana* (fig. 7).

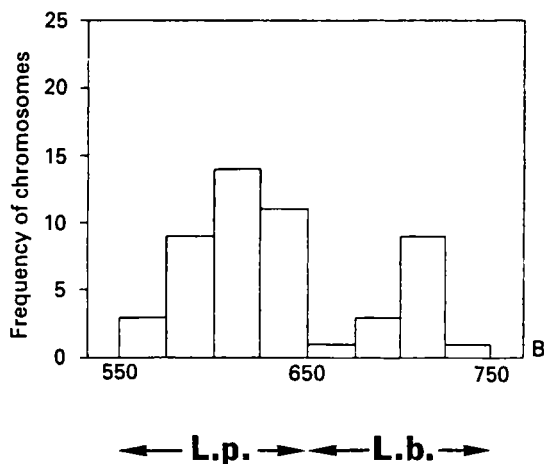


Fig. 7. — Distribution de taille des chromosomes hybridant avec la sonde pLb-134Sp chez *L. braziliensis* et *L. peruviana*. La classe de taille (25 kb) est définie par l'intervalle  $\geq$  limite inférieure et  $<$  limite supérieure (d'après DUJARDIN *et al.* 1995).

### 3.3.2. Comparaison du polymorphisme caryotypique chez *L. peruviana* et *L. braziliensis*

Les différents chromosomes étudiés ne présentent pas des variations de taille de même amplitude au sein de *L. peruviana* et *L. braziliensis*.

Chez *L. braziliensis*, la dissimilarité caryotypique maximale (CSDI mesuré à partir de la taille des 4 chromosomes) atteint une valeur de 325 kb (DUJARDIN *et al.* 1995). Le polymorphisme caryotypique de cette espèce est essentiellement dû à la variation de taille du chromosome pLb-22.

Chez *L. peruviana*, la dissimilarité caryotypique maximale (CSDI) atteint une valeur double de celle de *L. braziliensis* (695 kb ; DUJARDIN *et al.* 1995). Ce sont les chromosomes pLb-22 et pLb-168 qui contribuent le plus à ce polymorphisme. L'étude de la distribution de leur taille permet une classification très précise des stocks de *L. peruviana* (DUJARDIN *et al.* 1993b). En effet, les 2 chromosomes présentent une distribution bimodale (pLb-22 :  $1\ 369 \pm 156$  kb et  $1\ 146 \pm 78$  kb ; pLb-168 :  $690 \pm 23$  kb et  $634 \pm 29$  kb). En considérant chaque mode comme un caractère et en les combinant, 8 populations caryotypiques, ou caryodèmes, ont été observées au sein de cette espèce (tableau 5). Ces caryodèmes représentent 8 combinaisons sur les 9 théoriques et indiquent différents degrés de similarité (pour ces deux chromosomes) par rapport à *L. braziliensis*. Les 2 caryodèmes majeurs dans notre échantillon sont PA4 (24 %) et PA2 (42 %), et représentent respectivement les caryodèmes les plus semblables et les plus différents par rapport à *L. braziliensis*. Des caryodèmes intermédiaires ont été observés, pour lesquels la dissimilarité est limitée au seul chromosome pLb-168 (PA1) ou pLb-22 (PA5). Enfin, il existe également des caryodèmes «mixtes» qui présentent deux variants de l'un ou des deux

**Tableau 5**

Caractéristiques des 9 caryodèmes théoriques de *L. peruviana*, basées sur les variations de taille (kb) des chromosomes hybridant avec les sondes pLb-22 et -168. (Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre d'isolats observés pour chaque caryodème ; \*, caractéristiques de *L. braziliensis*)

		$1\ 369 \pm 165^*$	<b>pLb-22</b> $1\ 146 \pm 78$	$1\ 369 \& 1\ 146$
<b>pLb-168</b>	$690 \pm 23$ $634 \pm 29^*$ $690 \& 634$	PA1 (5) PA4 (11) PA7 (2)	PA2 (19) PA5 (3) PA8 (2)	PA3 (1) PA6 (0) PA9 (2)

chromosomes, un variant appartenant à la même catégorie que celle de *L. braziliensis* et l'autre différant (PA3, PA7, PA8, PA9).

*L. peruviana* est donc caryotypiquement (pour les 4 chromosomes étudiés) plus hétérogène que *L. braziliensis*. Cette caractéristique, ainsi que le fait que les Andes sont éco-géographiquement plus hétérogènes que la forêt, montrent que les populations de *L. peruviana* constituent le modèle le plus adéquat pour étudier dans quelle mesure la variation génétique infraspécifique des parasites pourrait être liée à des différences écologiques.

### 3.3.3. Structuration éco-géographique des populations de *L. peruviana*

Quand la variabilité caryotypique de *L. peruviana* est resituée dans son contexte bio-géographique (BGU), il apparaît une forte structuration éco-géographique.

L'analyse en composante principale de la variation de taille des 4 chromosomes est une première méthode permettant de visualiser cette structuration. En effet, il apparaît que les 2 axes principaux de l'analyse (fig. 8) comptent pour 81 % de la variabilité totale et groupent tous

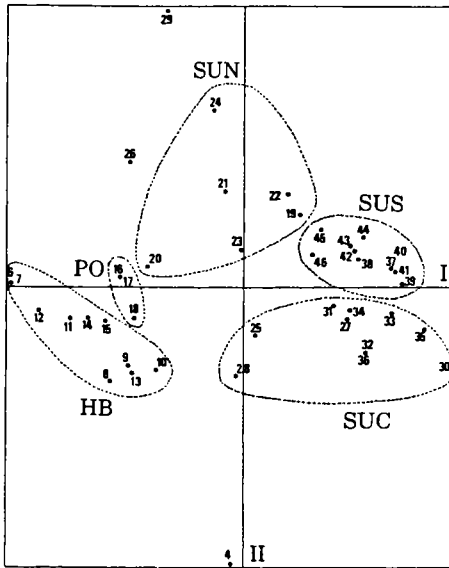


Fig. 8. — Analyse en composante principale de la taille des chromosomes hybridant avec les sondes pLb-22, pLb-134Sg, pLb-134Sp et pLb-168Sg. Les axes principaux sont responsables de 57,6 % (I) et 23,3 % (II) de la variabilité totale (d'après DUJARDIN *et al.* 1993b). BGU : SUN, Surco-Nord ; SUS, Surco-Sud ; PO, Porculla ; HB, Huancabamba ; SUC, Surco-Centre.

les isolats en fonction de leur BGU d'origine, à l'exception de 2 isolats de la BGU de Surco-Centre (codés 26 et 29 dans la fig. 8) (DUJARDIN *et al.* 1993b). En d'autres termes, la constitution caryotypique des isolats de *L. peruviana* est différente d'une BGU à l'autre.

Une deuxième analyse (fig. 9) confirme cette structuration et précise qu'il s'agit d'un cline (changement progressif de fréquence de gènes ou de phénotypes dans une population, le long d'un transect géographique). Ainsi, la distribution des 2 caryodèmes majeurs montre que le caryodème PA4 est le seul présent à Huancabamba (extrême Nord du transect andin), qu'il diminue fortement à Surco-Nord (10 % des caryodèmes présents) et qu'il est absent plus au sud. En parallèle, PA2 apparaît à Surco-Nord (10 %), augmente sa fréquence à Surco-Centre (33 %) et est le seul caryodème présent à Surco-Sud. Le fait que l'on retrouve les caryodèmes intermédiaires et «mixtes» entre ces formes extrêmes uniquement dans les BGU centrales (Surco-Nord et -Centre) pourrait s'expliquer par l'existence d'un cline de différenciation progressive d'un caryodème majeur vers l'autre.

Une troisième analyse (DUJARDIN *et al.* 1995) permet de proposer l'orientation de ce cline d'un point de vue géographique et évolutif.

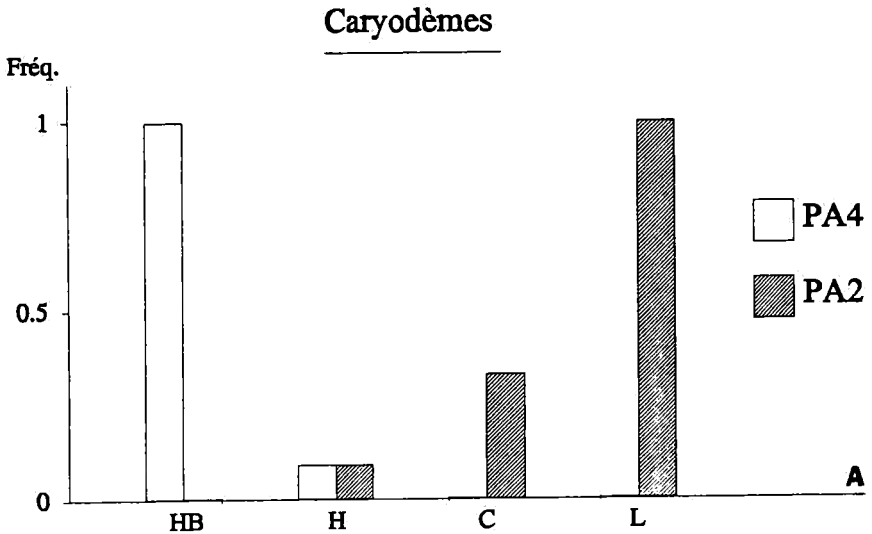


Fig. 9. — Fréquence des caryodèmes majeurs dans les foyers de Huancabamba (HB, situé dans la BGU de Huancabamba), Huayllacayan (H, situé dans la BGU de Surco-Nord), Canta (C, situé dans la BGU de Surco-Centre) et Lucanas (L, situé dans la BGU de Surco-Sud).

Pour ce faire, nous avons intégré les données de *L. braziliensis* et utilisé cette espèce voisine [et la plus ancienne du complexe *braziliensis* d'après des arguments phylogénétiques (GUERRINI *et al.* 1993)] comme point de référence pour une analyse phénétique (CSDI). Ceci montre que les isolats de *L. peruviana* provenant de Huancabamba (BGU située à l'extrême Nord du transect, tout près de la passe de Porculla — lieu de passage privilégié entre la forêt et la côte — et où circule uniquement PA4) sont plus proches de *L. braziliensis* que des *L. peruviana* centrales et méridionales (fig. 10). Ces résultats montrent un gradient de différenciation caryotypique des différentes populations de *L. peruviana* par rapport à *L. braziliensis* et son parallélisme par rapport à un gradient éco-géographique (de la forêt vers la région xérophyte de Surco-Sud). Cette observation suggère donc que *L. peruviana* serait issue de *L. braziliensis* et aurait commencé sa différenciation caryotypique et sa colonisation du Piémont Pacifique des Andes à Huancabamba. Ensuite, *L. peruviana* aurait accentué sa différenciation caryotypique d'une BGU à l'autre, lors de sa migration vers le sud.

#### 3.3.4. Comparaison des variations caryotypique et isoenzymatique

Afin de situer la variabilité génomique par rapport à la variabilité des séquences nucléotidiques, nous avons comparé sur les mêmes isolats de *L. peruviana* les données de caractérisation caryotypique et isoenzymatique [ces dernières ayant été obtenues par deux collaboratrices de l'ORSTOM-Montpellier, GUERRINI (1993) et BANULS (1993)].

Les principaux résultats de l'analyse isoenzymatique (effectuée sur 17 loci) sont (i) la distinction de *L. braziliensis* et *L. peruviana* par leurs électromorphes du locus de la Mannose Phosphate Isomérase (MPI) ; et au sein de *L. peruviana*, (ii) la très faible variabilité (7 loci variables sur 17, dont 4 ne présentent un variant que chez 1 isolat) ; ainsi que (iii) la distinction entre les populations de Huancabamba et les autres par leurs électromorphes du locus de la Nucléoside Hydrolase (NH2).

La comparaison des données a été effectuée respectivement à partir des CSDI calculés entre toutes les paires d'isolats sur base des 4 chromosomes variables et des distances de Jaccard (1908) calculées entre les mêmes paires d'isolats sur base des 17 systèmes enzymatiques. Il existe une corrélation entre ces deux paramètres ( $r = 0,34$ ), mais la portion de la variation enzymatique totale pouvant être expliquée par une fonction linéaire de la variation caryotypique est assez faible

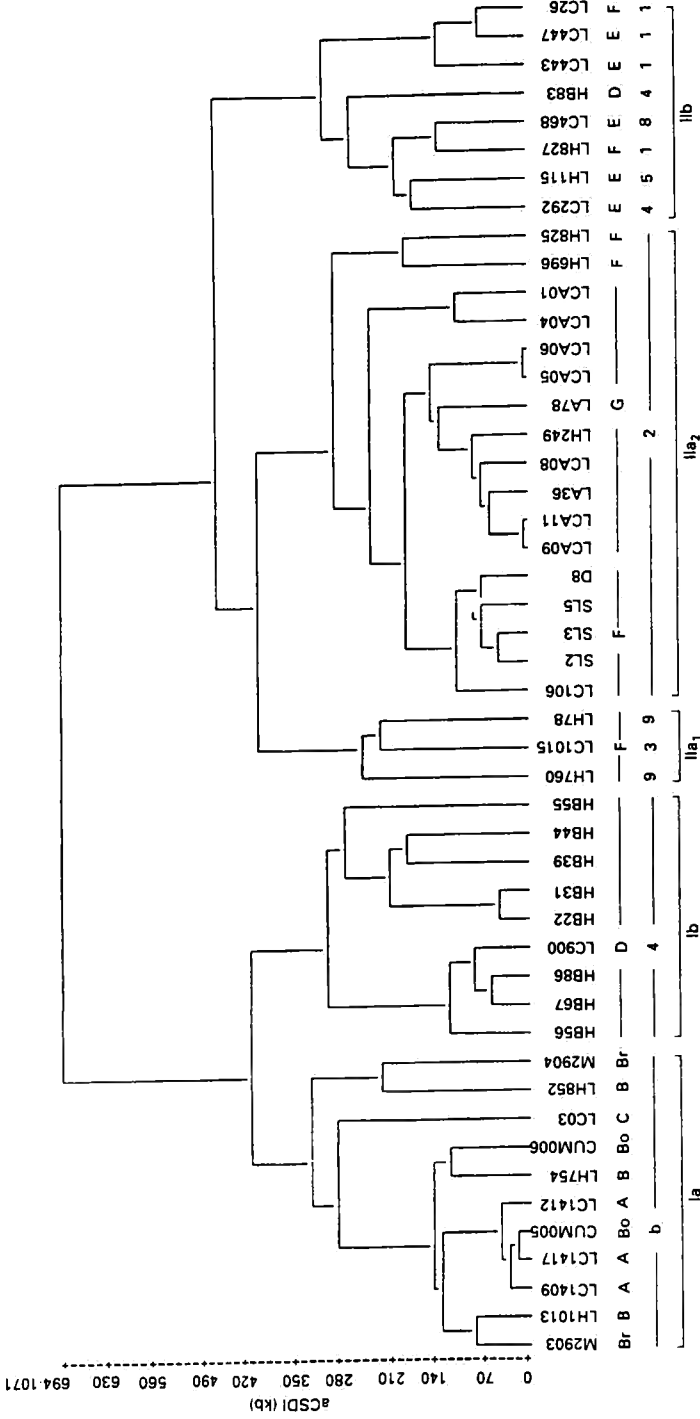


Fig. 10. — Dendrogramme construit à partir des indices CSDI. On retrouve sous le dendrogramme : le code des isolats, leur origine géographique (Br, Brésil ; Bo, Bolivie ; A-G : BGu péruviennes : A, Huallaga/Huanuco ; B, Chanchamayo/Santa Ana ; C, Inambari ; D, Huancabamba ; E, Surco-Nord ; F, Surco-Centre ; G, Surco-Sud), leur espèce (b, *L. braziliensis*) ou les caryodèmes de *L. peruviana* (1-9), ainsi que les agglomérats auxquels ils appartiennent. D'après DUJARDIN *et al.* 1995.

( $r^2 \times 100 = 11,6 \%$ ). La comparaison est plus intéressante encore quand on rapporte chacun des 2 paramètres à la variation éco-géographique (mesurée en km séparant chacun des foyers de celui de Huancabamba). On trouve une corrélation dans les 2 cas ( $r = 0,78$  et  $0,28$  respectivement pour les distances caryotypiques et isoenzymatiques). Cependant, la portion de la variation totale des caractères génomiques/génétiques étudiés qui peut être expliquée par une fonction linéaire de la distance éco-géographique est fortement différente :  $62,3 \%$  pour les 4 chromosomes et seulement  $8 \%$  pour les 7 isoenzymes. On pourrait objecter que nous avons comparé 4 chromosomes dont les variants se retrouvent plus d'une fois dans la population à 7 isoenzymes dont 4 présentent un variant chez un isolat seulement. Cependant, même si on écarte ces 4 systèmes isoenzymatiques de l'analyse de corrélation, on retrouve une dépendance vis-à-vis de la distance éco-géographique très faible ( $17 \%$  de la variation totale).

En conclusion, il existe une importante divergence entre la variation des chromosomes et des isoenzymes. L'expression la plus intéressante de cette divergence est la plus grande dépendance du polymorphisme des chromosomes étudiés par rapport à la distance éco-géographique. Ce résultat a deux implications. Premièrement, les variations chromosomiques et isoenzymatiques semblent promues par des mécanismes différents, et il est vraisemblable que la nature et le degré des pressions sélectives diffèrent selon le type de caractères. Deuxièmement, il est clair que les chromosomes constituent des caractères particulièrement bien adaptés à l'analyse fine de la variabilité du parasite dans un contexte éco-géographique.

### 3.3.5. Conclusion partielle

A ce stade-ci du travail, nous avons répondu à la première question posée par l'hypothèse « parasite » et montré que *L. braziliensis* et *L. peruviana* étaient nettement différents d'un point de vue caryotypique, et qu'à l'intérieur de *L. peruviana*, des populations génétiquement différentes étaient endémiques d'une BGU andine à l'autre. Ces différences d'endémisme semblent refléter une colonisation effectuée selon un gradient de différenciation par rapport à *L. braziliensis*, croissant du Nord au Sud (au fur et à mesure que l'on s'éloigne de Huancabamba, au Nord des Andes péruviennes, tout près de l'unique lieu de passage entre la forêt et la côte). Nous pouvons à présent passer à la seconde question et voir dans quelle mesure les différences



génétiques observées pourraient jouer un rôle dans les différences de virulence.

### 3.4. ASSOCIATION ENTRE VARIABILITE CARYOTYPIQUE ET VIRULENCE

La juxtaposition des données concernant la variabilité caryotypique des parasites et le tableau clinique chez l'homme (à partir de l'analyse décrite en pp. 22-24) montre un parallèle (tableau 6a). D'une part, le chromosome pLb-134Sp est plus grand chez les parasites ayant la potentialité de produire un espundia (*L. braziliensis*). D'autre part, au sein de *L. peruviana*, le caryodème PA4 se retrouve chez des patients présentant des lésions nombreuses et grandes, alors que les caryodèmes PA2 et intermédiaires se retrouvent chez des patients montrant des lésions peu nombreuses et petites. Afin de savoir s'il pourrait éventuellement y avoir un lien de cause à effet entre la variation caryotypique et clinique, 2 questions doivent être résolues. Premièrement, il faut savoir si les différences de virulence observées chez l'homme (avec toutes les variables génétiques et immunologiques qu'il peut comporter) se reproduisent dans un système simple, homogène et contrôlé (*in vitro* ou *in vivo*). Deuxièmement, il faut identifier au sein des chromosomes dont la variation est corrélée à un effet phénotypique, des séquences

**Tableau 6**

Association entre variabilité caryotypique et virulence

PHENOTYPE	REGION	CARYOTYPE
<b>a. Chez patients</b>		
potentialité d'espundia absence de potentialité lésions nombreuses et grandes lésions petites et peu nombreuses	Forêt Andes Andes, Huancabamba Andes, Surco- Nord et Centre	pLb-134Sp : ± 700 kb pLb-134Sp : ± 600 kb pLb-22 : > 1,300 kb et pLb-168 : ± 640 kb (PA4) pLb-22 : < 1,300 kb et/ou pLb-168 : ± 700 kb (PA2 et intermédiaires)
<b>b. In vitro</b>		
taux de multiplication élevé taux de multiplication bas	Andes, Huancabamba Andes, Surco-Sud	pLb-22 : > 1,300 kb et pLb-168 : ± 640 kb (PA4) pLb-22 : ± 1,100 kb et pLb-168 : ± 700 kb (PA2)

jouant un rôle potentiel dans la virulence et dont les fonctions auraient pu être altérées lors des réarrangements chromosomiques.

### 3.4.1. Différences de virulence entre caryodèmes

En ce qui concerne *L. braziliensis* et *L. peruviana*, des travaux précédents (AREVALO, communication personnelle) ont montré, dans un système d'infection *in vitro* de macrophages, une capacité multiplicative plus grande chez la première espèce.

Afin d'étudier la variabilité de la virulence chez *L. peruviana*, nous avons analysé la capacité multiplicative de promastigotes *in vitro*. Nous avons donc comparé, en culture, les courbes de croissance de promastigotes appartenant aux deux caryodèmes «extrêmes» de *L. peruviana*, PA4 (originaire de Huancabamba) et PA2 (originaire de Surco-Sud), respectivement le caryodème le plus proche et le plus éloigné de *L. braziliensis*. Quatre paires d'isolats (avec le même nombre de repiquages depuis l'isolement) appartenant aux deux caryodèmes ont été constituées au hasard, et une paire a été analysée par semaine de la façon suivante. Une même quantité de promastigotes ( $30.10^6$ ) a été inoculée dans un même volume (15 ml) de milieu de culture et un comptage quotidien a été effectué. Les résultats sont nets : les promastigotes du caryodème PA4 poussent plus vite que ceux de PA2 et atteignent un plateau plus élevé (tableau 7, fig. 11).

Ces résultats vont donc dans le même sens que ceux observés chez les patients : les parasites du caryodème PA4 sont plus virulents (dans le sens multiplicatif du terme, tableau 6b) dans un système *in vitro* homogène et contrôlé et se retrouvent dans les régions du Pérou où les lésions humaines sont les plus graves (tableau 6a). La constitution génétique du parasite semble donc impliquée dans les différences de virulence.

### 3.4.2. Etude des séquences nucléotidiques impliquées dans la variation caryotypique

Sachant que des différences de virulence entre *L. braziliensis* et *L. peruviana*, et entre caryodèmes de *L. peruviana* pourraient être dues à des différences génétiques, il reste à savoir si ce lien de cause à effet pourrait se situer dans les différences caryotypiques observées. En effet, les caractères caryotypiques pourraient n'être que des marqueurs indirects et être corrélés à une autre différence génétique (non identifiée à ce stade-ci) qui serait directement responsable des différences de

**Tableau 7**

Courbes de croissance d'isolats de *L. peruviana* des caryodèmes PA4 et PA2 : A, données brutes des comptages quotidiens (en millions de parasites / ml de surnageant) ; Rep. = nombre de repiquages depuis isolement (début/fin d'expérimentation) ; r = rapport calculé pour chaque paire d'isolats entre les valeurs observées chez PA4 et PA2 (2<sup>e</sup> et 1<sup>er</sup> codes respectivement) ; B, paramètres mesurés sur les courbes de croissance respectives (Fig. 11) ; p = pente jusqu'à la première inflexion ; Max = Maximum atteint durant la croissance (également indiqué en gras)

Paire	1			2			3			4				
Rep.	LCA04 10/14	HB31 10/15		LCA08 10/16	LC900 9/15		LCA06 5/10	HB86 12/17		LCA05 11/15	HB67 10/16			
<b>A</b>														
Jour			r			r			r			r	moy.r	σr
0	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	-	-
1	6	8,625	1,4	3,25	5,87	1,8	2,12	4	1,9	2,3	10	4,3	-	-
2	<b>12,25</b>	15,25	1,2	5,75	8,87	1,5	3,9	8,5	2,2	4,2	<b>13</b>	3,1	-	-
3	11,5	11,5	1	<b>9,37</b>	<b>12,6</b>	1,3	5,7	10	1,7	<b>6,9</b>	8,1	1,2	-	-
4	7,5	<b>19,37</b>	2,6	7,8	6,1	0,8	4,7	<b>11,2</b>	2,4	5,6	10,7	1,8	-	-
5	7,5	12,75	1,7	-	-	-	-	10,1	-	-	-	-	-	-
<b>B</b>														
p	5,12	6,62	1,3	2,46	3,48	1,4	1,29	2,44	1,9	1,66	5,5	3,3	2,0	0,8
Max	12,25	19,37	1,6	9,37	12,6	1,3	5,7	11,2	1,9	6,9	13	1,9	1,7	0,2

virulence. Afin de répondre à cette question, nous avons donc cherché à savoir si certaines fonctions-clef étaient codées dans les 4 chromosomes analysés, et si les gènes responsables étaient impliqués dans les réarrangements. Sur ces 4 chromosomes, 2 ont été étudiés quant à leur contenu en gènes.

#### a. Analyse du chromosome pLb-134Sp

Le premier chromosome analysé en détail est le chromosome pLb-134Sp, variable entre *L. braziliensis* et *L. peruviana*. En regardant avec plus d'attention les différentes hybridations effectuées, nous avons remarqué que dans de nombreux cas, la diminution de taille du chromosome d'une espèce à l'autre était associée à une diminution d'intensité d'hybridation (pour une même quantité d'ADN chargée, fig. 12a). Ceci peut être dû à (i) une différence d'homologie dans la séquence reconnue par pLb-134Sp dans les grands et petits variants ; ou (ii) à un nombre de copies différent de cette séquence. Dans les deux cas, la première chose à faire est de caractériser cette séquence.

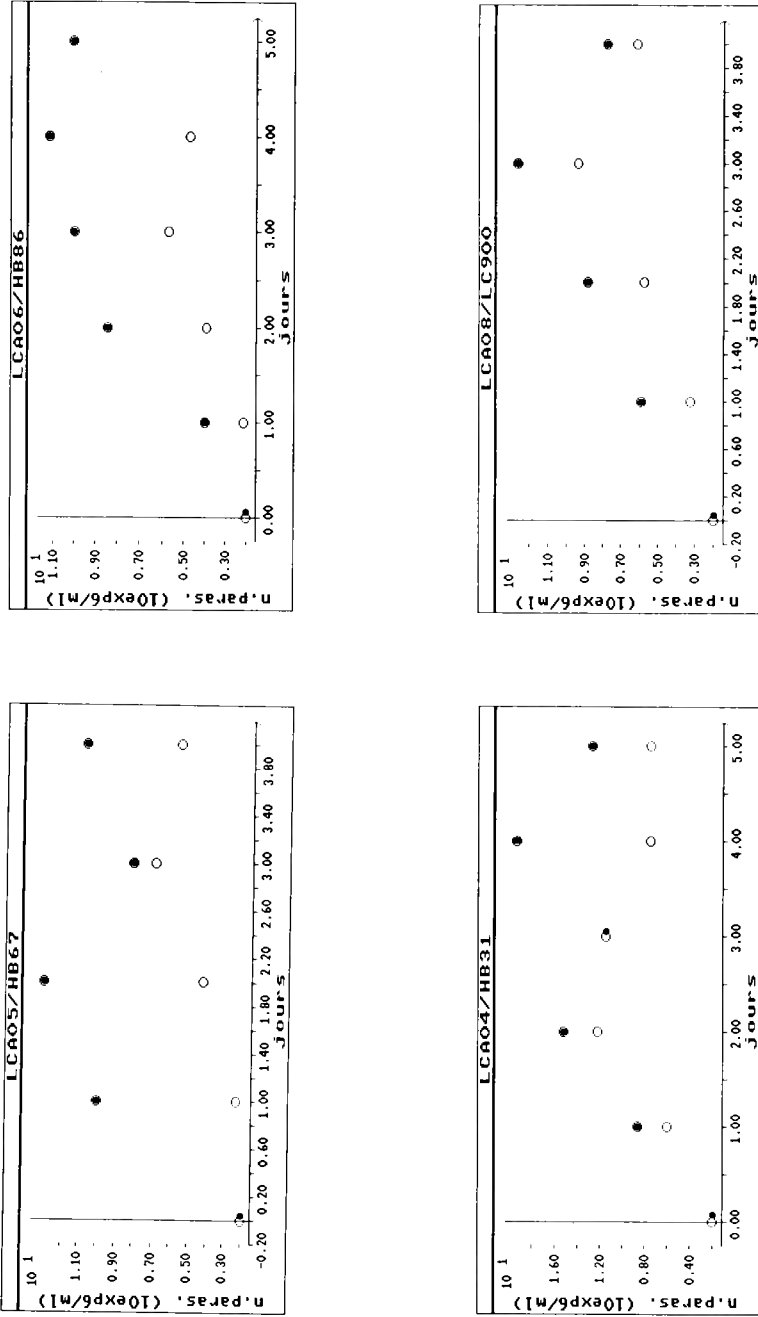


Fig. 11. — Courbes de croissance d'isolats de *L. peruviana* appartenant aux caryodèmes PA4 (●) et PA2 (○) ; chaque graphique correspond à une paire d'isolats des caryodèmes respectifs ensemencés en même temps sur un même lot de milieu de culture.

Nous avons donc séquencé le fragment d'ADN contenu dans la sonde et comparé la séquence obtenue à une banque de données. Ceci a montré que pLb-134Sp présentait 96,5 % de similitude avec un gène de la gp63 de *L. guyanensis* (DUJARDIN *et al.* 1994). Cette valeur de similitude est suffisamment haute pour conclure que notre sonde contient un fragment d'un gène de la gp63 de *L. braziliensis* (espèce dont elle a été clonée). De plus, le séquençage nous a appris que le fragment cloné appartenait à une région très conservée du gène, et que donc les différences d'hybridation observées entre *L. braziliensis* et *L. peruviana* (pour une même quantité d'ADN chargée) ne pouvaient être dues à des différences d'homologie dans les gènes gp63 des deux espèces, mais vraisemblablement à un nombre différent de copies (donc à un réarrangement).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons clivé de l'ADN génomique des 2 espèces avec différentes enzymes de restriction et hybridé avec la sonde pLb-134Sp. Les patrons obtenus dans les 2 espèces sont tout à fait différents (DUJARDIN *et al.* 1994, VICTOIR *et al.* 1995). Dans le cas de l'enzyme Sall (fig. 12b), on observe 8 fragments chez *L. braziliensis* et 4 seulement chez *L. peruviana* ; sur ces 4 fragments, 3 présentent une taille semblable à un des fragments observés chez *L. braziliensis* et 1 diffère. Ceci suggère que la différence de patron de digestion chez les deux espèces ne peut être due uniquement à des mutations dans le site de reconnaissance de l'enzyme (faisant apparaître ou disparaître un site), mais bien à des délétions chez *L. peruviana* de certains fragments spécifiques de *L. braziliensis*, donc certaines copies de gènes gp63. Ce résultat est renforcé par la mesure des différences d'intensité totale d'hybridation de la sonde pLb-134Sp sur les produits de digestion d'ADN des 2 espèces (pour une même quantité d'ADN). Ceci a été effectué par un balayage densitométrique des autoradiographies correspondantes et a suggéré qu'en moyenne le nombre de gènes de la gp63 chez *L. braziliensis* était le double de celui estimé chez *L. peruviana* (VICTOIR *et al.* 1995).

Donc, la diminution de taille du chromosome pLb-134Sp de *L. braziliensis* vers *L. peruviana* est probablement associée à une diminution du nombre de copies des gènes de la gp63. Ce résultat révèle toute son importance quand il est remis dans le contexte fonctionnel de la gp63. En effet, il s'agit de la glycoprotéine de surface majeure des leishmanies, qui est impliquée dans les interactions avec les macrophages et la survie intralysosomale (MEDINA-ACOSTA *et al.*

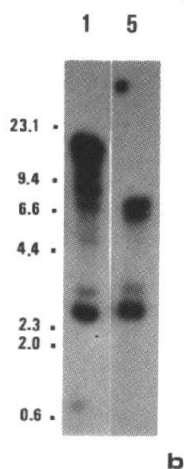
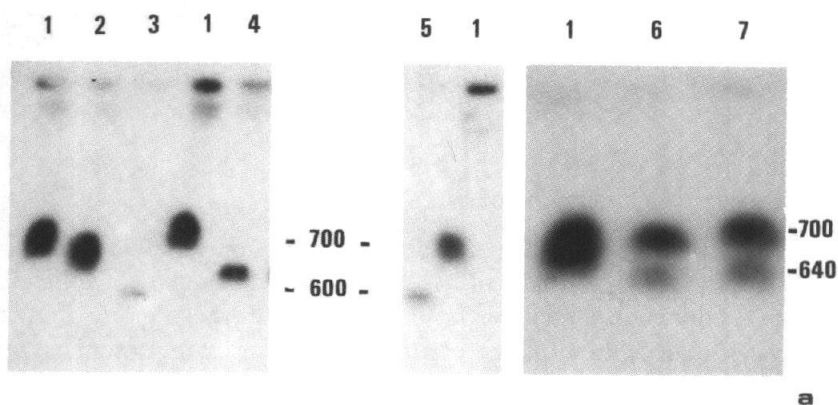


Fig. 12. — a. Polymorphisme de taille des chromosomes contenant les gènes de la gp63 chez des leishmanies du complexe *braziliensis*. On remarque que l'intensité d'hybridation de la sonde pLb-134Sp (gp63) est plus faible pour les petits variants chromosomiques de *L. guyanensis* M5378 (3), LEM669 (4) et *L. peruviana* LC26 (5) que pour les grands variants de *L. braziliensis* M2903 (1) et M2904 (2). Les stocks 6 (LC1408) et 7 (LC1418) correspondent à des hybrides entre *L. braziliensis* et *L. peruviana* et présentent également une hybridation moins intense du petit variant chromosomique par rapport au grand. b. Patron polymorphe d'ADN génomique de *L. braziliensis* M2903 (1) et *L. peruviana* LC26 (5) clivé avec l'enzyme Sall et hybridé avec la sonde pLb-134Sp. Les tailles sont indiquées en kb. D'après DUJARDIN *et al.* 1994.

1993). De plus, il a été montré que l'infectivité de *L. braziliensis* augmentait avec l'accumulation de gp63 (KWEIDER *et al.* 1987) et qu'un variant de *L. amazonensis* déficient en gp63 était rendu plus infectieux après transfection avec un gène gp63 de *L. major* (LIU & CHANG 1992). Dans ce contexte, la diminution du nombre de copies de gènes gp63 pourrait contribuer à expliquer la différence de virulence observée entre les 2 espèces.

#### b. Analyse du chromosome pLb-22

Le deuxième chromosome sélectionné pour une analyse fine était celui reconnu par la sonde pLb-22. Au cours de notre travail, nous avons eu l'occasion d'analyser la localisation chromosomique d'autres séquences que celles utilisées comme sondes jusqu'à présent. L'une d'elles, contenant un fragment de la sous-unité 16S (ssu) des gènes de l'ADN ribosomal (ADN-r) s'est avérée être liée physiquement sur le même chromosome que la séquence reconnue par pLb-22. De plus, nous avons observé dans de nombreux cas que la diminution de taille du chromosome était accompagnée d'une diminution d'intensité d'hybridation (pour une même quantité d'ADN chargée) avec la sonde ssu (fig. 13). Le fragment de gène ribosomal contenu dans la sonde est extrêmement conservé [presque 100 % d'homologie sur une longueur de 800 bp au sein du genre *Leishmania* entier (VAN EYS *et al.* 1992)] : les différences d'intensité d'hybridation observées ne peuvent donc être dues à des différences d'homologie et suggèrent des variations de nombre de copies des gènes ribosomiaux. Les données de la littérature appuient cette hypothèse. En effet, d'une part, chez *L. infantum* un nombre de 160 copies d'unités de transcription des gènes ribosomiaux a été estimé par génome haploïde (LEON *et al.* 1976) et, d'autre part, la longueur moyenne de l'unité de transcription de leishmania a été évaluée à  $\pm 15$  kb (RAMIREZ & GUEVARA 1987). A partir de ces informations, et connaissant la taille des chromosomes contenant les gènes ribosomiaux chez *L. braziliensis* et *L. peruviana* (de 1 400 à 1 100 kb), il est vraisemblable que la plus grande partie du chromosome est constituée de gènes ribosomiaux. Donc, en cas de réarrangement de ce chromosome (entraînant des variations jusqu'à 300 kb), la probabilité que les gènes ribosomiaux soient impliqués dans ces réarrangements est très grande.

Une diminution du nombre de copies de gènes ribosomiaux pourrait avoir des effets sur le métabolisme général des leishmanies, puisqu'elle

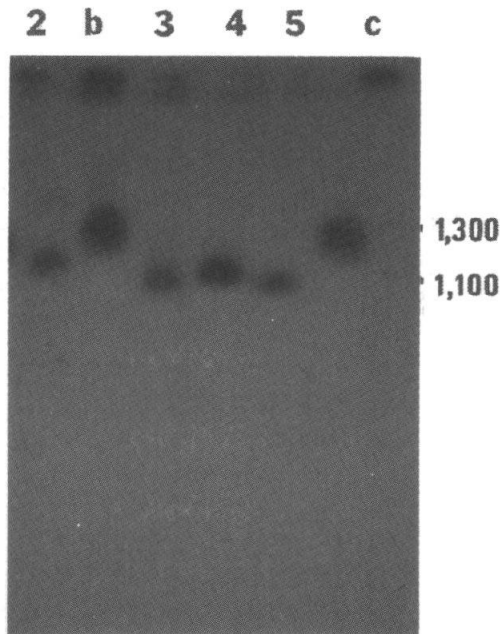


Fig. 13. — Hybridation de la sonde ssu sur des chromosomes de *L. braziliensis* M2903 (b,c) et *L. peruviana* LH115 (2), LC106 (3), LCA11 (4) et LH249 (5). On remarque que l'intensité d'hybridation de la sonde est généralement plus faible pour les petits variants chromosomiques. Pulse : 115s ; taille en kb.

pourrait entraîner une diminution du nombre de ribosomes, donc une efficacité moins grande de la machinerie de synthèse protéique. Ceci a été prouvé chez la drosophile, où les mutations qui affectent les protéines ribosomales (*Minute*) ou le nombre de copies de gènes ribosomiaux (*bobbed*) mènent dans les deux cas à une réduction de la taille des soies et dans le cas des mutants «Minute» à un retard au point de vue développement (ASHBURNER 1989). En fonction de ces éléments, la diminution du nombre de gènes ribosomiaux soupçonnée au sein de *L. peruviana* pourrait contribuer à expliquer les différences de virulence observées entre les 2 espèces.

### 3.4.3. Conclusion partielle

L'analyse de la virulence *in vitro* et du contenu génétique des chromosomes pLb-134Sp et pLb-22/ssu permet de donner un élément



de réponse à la deuxième question posée par l'hypothèse «parasite». En effet, des parasites (*L. braziliensis* - *L. peruviana* et différentes populations de *L. peruviana*) qui sont associés à des pathologies de gravité variable présentent des différences de virulence *in vitro* qui pourraient être expliquées (en tout cas partiellement) par des réarrangements chromosomiques impliquant des gènes codant pour des fonctions vitales chez les parasites respectifs. De plus, il apparaît que la virulence varie selon le même gradient Nord-Sud que la constitution caryotypique des parasites : plus on s'éloigne de Huancabamba (tout près de l'unique passage entre la forêt et la côte), plus on s'écarte du caractère virulent présenté par *L. braziliensis*.

#### 4. Conclusion générale, hypothèses et perspectives

Dans ce travail, cinq observations marquantes ont été effectuées. Premièrement, la lecture de données épidémiologiques de base selon une trame éco-géographique (BGU de Lamas) a montré que les différences environnementales (naturelles ou dues au degré d'anthropisation) étaient corrélées à des variations dans la clinique et dans l'endémisme des espèces d'insectes vecteurs. Deuxièmement, l'analyse caryotypique des leishmanies a révélé des populations parasitaires génomiquement différentes d'un environnement à l'autre (DUJARDIN *et al.* 1993b, DUJARDIN *et al.* 1995). Troisièmement, l'étude *in vitro* de ces mêmes populations a montré des différences dans leur virulence (taux de croissance) allant dans le même sens que les différences cliniques. Quatrièmement, l'analyse fine du contenu génétique des chromosomes variant entre ces populations a révélé qu'ils contenaient des gènes répétés et codant pour des fonctions touchant à la virulence (gp63 et ADN-r), et a montré que les gènes de la gp63 étaient réarrangés chez les variants chromosomiques (DUJARDIN *et al.* 1995, VICTOIR *et al.* 1995). Cinquièmement, nous avons montré que toutes ces différences se présentaient selon un gradient parallèle, partant de la forêt vers le sud des Andes (ou *vice versa*) : plus on s'éloigne de la forêt (en passant par la BGU de Huancabamba), plus les parasites diffèrent de *L. braziliensis* dans leur constitution génétique (DUJARDIN *et al.* 1995) et dans leurs propriétés biologiques (virulence). Toutes ces observations convergentes permettent de formuler deux hypothèses importantes.

##### 4.1. HISTOIRE NATURELLE ET ECO-EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSES PERUVIENNES

La première hypothèse souligne le rôle potentiel du parasite (via le vecteur) dans l'association entre l'environnement et la clinique, et permet d'expliquer — dans un contexte historique et écologique — la dynamique épidémiologique des leishmanioses péruviennes. La polarité de cette hypothèse s'appuie sur des données phylogénétiques (GUERRINI 1993) et écologiques (caractère primitif des hôtes sylvatiques comme les édentés), qui suggèrent que *L. braziliensis* est l'espèce la plus ancienne du complexe *braziliensis*. Cette espèce et l'environnement

qu'elle occupe pourraient donc être considérés comme le point de départ des différents gradients observés dans ce travail.

Donc, dans la forêt, circule dans un cycle sauvage *L. braziliensis*, un parasite ayant un grand chromosome porteur de gènes ribosomaux et vraisemblablement le double de gènes de la gp63 par rapport à *L. peruviana*, très virulent *in vitro* et responsable de pathologies très graves chez l'homme qui pénètre accidentellement dans le cycle.

Il semblerait qu'à une certaine époque, un variant caryotypique (PA4) ait quitté la forêt et ait colonisé les vecteurs eux-mêmes adaptés aux conditions écologiques différentes (altitude, anthropisation) existant dans la BGU de Huancabamba (située dans le Nord des Andes péruviennes, tout près de l'unique passe entre la forêt et la côte) : cette association pourrait être spécifique et déterminée à un niveau moléculaire comme l'a documenté un travail récent (PIMENTA *et al.* 1994). Ce variant appartient déjà à l'espèce *L. peruviana* (selon des critères clinico-géographiques et isoenzymatiques), mais caryotypiquement, il est plus proche de *L. braziliensis* : la seule différence caryotypique observée est la taille du chromosome portant les gènes gp63. Il possède vraisemblablement 2 fois moins de gènes de cette glycoprotéine majeure de surface [impliquée dans la virulence chez d'autres espèces (KWEIDER *et al.* 1987, LIU & CHANG 1992)] que *L. braziliensis*, et cela pourrait expliquer sa moins grande virulence par rapport à cette espèce, entre autres son incapacité à produire des lésions muqueuses chez les patients infectés.

A partir de Huancabamba et de la population parasitaire endémique, des clones «colons» seraient alors descendus pour envahir les BGU méridionales. A Surco-Nord et Centre, des variants différant déjà plus de *L. braziliensis* que PA4 se seraient adaptés aux vecteurs domestiques endémiques dans ces régions xérophytes et fortement anthropisées. Ces variants ont un nombre réduit de gènes gp63 comme les autres *L. peruviana*, mais certains d'entre eux présentent en plus une réduction de la taille du chromosome portant les gènes ribosomaux et vraisemblablement un réarrangement de ces gènes essentiels. Ces variations caryotypiques vont de pair avec une diminution de la pathogénicité chez l'homme.

Enfin, à Surco-Sud (à l'extrême limite de la distribution de *L. peruviana*), un variant (PA2), qui avait commencé à apparaître au centre, semble le seul à coloniser le vecteur adapté à cette BGU xérophyte. Parmi tous les *L. peruviana*, ce variant est le plus différent de *L. braziliensis* : la taille de son chromosome «ribosomal» est la plus basse

rencontrée dans le transect, et *in vitro* il est le moins virulent. D'un point de vue parasitologique, ce variant serait le plus adapté à son environnement puisqu'il épargne le plus son hôte.

En résumé, selon notre hypothèse, (i) différents vecteurs se seraient donc adaptés aux différentes conditions écologiques de la forêt et des BGU andines ; (ii) différentes populations génétiques de parasites auraient colonisé ces différentes BGU via leur adaptation aux vecteurs endémiques, à partir de la population sylvatique de l'espèce *L. braziliensis*, espèce la plus primitive du complexe *braziliensis* et responsable de *l'espundia* ; et (iii) certaines de ces différences génétiques touchant des fonctions clefs seraient responsables de différences dans la virulence des parasites.

Différentes données devraient être obtenues afin de confirmer cette hypothèse. Tout d'abord, une étude entomologique devrait confirmer la nature du vecteur à Huancabamba. Ensuite, des parasites isolés directement des vecteurs devraient être étudiés : jusqu'à présent, nous avons travaillé par syllogisme (sauf pour Surco-Sud) et postulé que les parasites isolés dans une BGU où une espèce vectorielle était endémique s'étaient adaptés à cet insecte. Etant donné la difficulté d'isoler des parasites d'insectes (taux d'infection  $< 1/2\ 000$ ), un développement technologique sera nécessaire alliant la possibilité d'études génétiques sans mise en culture (par amplification PCR de l'ADN, par exemple) à la valeur informative du caryotype moléculaire. Enfin, il nous faut prouver le rôle des réarrangements de certains gènes (gp63 et ribosomaux) dans les phénotypes de virulence. Les nouveaux outils de génie génétique [complémentation génique, suppression sélective de certains gènes (CRUZ *et al.* 1993)] permettront de manipuler l'équipement génique de ces parasites et tester ses effets dans un système de virulence *in vitro*.

#### 4.2. PLASTICITE GENOMIQUE ET INNOVATION

L'hypothèse précédente a suggéré le rôle du parasite dans l'éco-épidémiologie des leishmanioses péruviennes. Nos résultats nous permettent d'aller plus loin encore et de proposer une seconde hypothèse afin de comprendre quels éléments et mécanismes intrinsèques pourraient appuyer ce rôle. Cette hypothèse suggère l'implication du génome parasitaire et de sa plasticité dans l'association entre l'environnement et la clinique.

Cette étude, ainsi que d'autres (PAGES *et al.* 1989, BLAINEAU *et al.* 1992, LIGHTHALL & GIANNINI 1992), ont démontré le degré important de plasticité génomique chez les leishmanies : par comparaison, les différences révélées par l'analyse des isoenzymes se sont avérées nettement moins importantes dans le modèle *L. braziliensis* - *L. peruviana* ici étudié. L'observation de séquences répétées (gp63 et ADNr) dans les 2 chromosomes variables étudiés, et dans d'autres cas [mini-exon (IOVANNISCI & BEVERLEY 1989)], suggère un rôle essentiel de la répétition de séquences nucléotidiques dans la plasticité du génome : ces séquences peuvent être amplifiées, transloquées ou délétées par *crossing over* inégaux. La signification de ces réarrangements chromosomiques apparaît d'autant plus importante que les séquences répétées codent pour des fonctions essentielles (gp63, glycoprotéine majeure de surface impliquée dans les interactions hôtes-parasites ; ADNr, machinerie de synthèse protéique ; mini-exon, activité des ARNm). Des réarrangements de ces séquences (effet de position, dosage génique, ...) sont donc susceptibles de provoquer des effets phénotypiques, donc des caractéristiques sélectionnables par l'environnement (différences de *fitness*). Ceci nous amène tout naturellement à proposer l'hypothèse de la signification adaptative de la variabilité génomique (au niveau de certains chromosomes en tout cas). Cette plasticité génomique pourrait ainsi jouer un rôle essentiel dans la génération de la diversité biologique des leishmanies et compenser le «manque à gagner» en terme d'innovation dû à la rareté de la recombinaison sexuelle.

Resituée dans le contexte global de cette étude, cette seconde hypothèse suggérerait que (i) de par leur teneur en séquences répétées, certains chromosomes seraient prédisposés à des réarrangements, (ii) que ces réarrangements pourraient entraîner des avantages/désavantages sélectifs quand ils impliquent des gènes importants, (iii) ce qui pourrait expliquer l'adaptation de différentes populations parasitaires dans différents environnements (vecteurs, ...), ainsi que (iv) les différences de virulence. Dans ce contexte, le génome et sa plasticité constitueraient une courroie de transmission importante entre l'environnement et la clinique.

Cette hypothèse pourrait être testée par la confirmation des effets phénotypiques dus aux réarrangements des gènes cités, par la recherche de gènes codant pour des fonctions essentielles dans d'autres chromosomes variables et par des études de transmission cyclique des différents variants caryotypiques dans les différents vecteurs associés naturellement.

### 4.3. PERSPECTIVES

Même si nos hypothèses doivent être testées dans leurs moindres recoins, il est certain que nous avons répondu à des questions essentielles pour l'éco-épidémiologie en démontrant la valeur de l'analyse caryotypique pour ce type d'études et en montrant que la variation clinique des leishmanioses péruviennes semblait avoir une composante génétique chez le parasite, qui était fortement promue par des facteurs environnementaux. Deux questions restent à être abordées pour avoir une vue globale de l'éco-épidémiologie des leishmanioses péruviennes. Premièrement, à l'intérieur de *L. braziliensis* (l'espèce la plus importante du point de vue de la Santé Publique), sont-ce également des différences génétiques qui font qu'une sous-population seulement de cette espèce peut produire des métastases muqueuses (chez 10 % de la population humaine atteinte)? La deuxième question (qui est liée à la première) est d'évaluer la contribution de l'homme au tableau clinique des leishmanioses néotropicales. Celle-ci peut jouer à court terme jusqu'à long terme, à cause des activités humaines qui entraînent des modifications du milieu et une anthropisation progressive du cycle leishmanien. A court terme, le profil épidémiologique de la maladie peut être affecté : augmentation du nombre de cas, augmentation du nombre de tranches d'âge touchées, ... Les résultats de notre étude suggèrent également qu'à moyen terme, un vecteur différent (ou plusieurs) pourrait s'adapter aux conditions écologiques anthropisées et pourrait donc sélectionner une population parasitaire mieux adaptée au nouveau cycle : il n'est pas exclu que dans un premier temps, ce soit un variant particulièrement pathogène qui circule. A long terme, par contre, il est probable que des parasites moins virulents soient sélectionnés par les contacts permanents entre l'homme et le parasite : pour un parasite, il y a avantage sélectif à épargner son hôte. Les exemples extrêmes de la leishmaniose sylvatique (zoonose, sévère) et andine [anthropo(zoo)nose, bénigne] décrits dans ce travail renforcent cette hypothèse. Enfin, il n'est pas impossible non plus que d'un environnement à l'autre, des populations humaines génétiquement et/ou immunologiquement différentes se soient adaptées, contribuant ainsi à expliquer les différences cliniques observées. En raison de la complexité des systèmes biologiques à étudier, trop peu de travaux sont effectués sur ce sujet, mais il est certain qu'ils pourraient éclairer d'un jour neuf la vision actuelle de l'épidémiologie des leishmanioses péruviennes.

BIBLIOGRAPHIE

- ANONYME. 1990. Lutte contre les leishmanioses. — Rapport d'un Comité OMS d'experts, Organisation Mondiale de la Santé, *Série des rapports techniques*, 793.
- ARANA, M., EVANS, D.A., ZOLESSI, A., LLANOS-CUENTAS, A. & AREVALO, J. 1990. Biochemical characterization of *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. — *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84 : 526-529.
- ASHBURNER, M. 1989. *Drosophila. A laboratory handbook*. — Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ASHFORD, R.W. & BETTINI, S. 1987. Ecology and epidemiology : Old World. — *In* : PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. (eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1, Academic Press, London, pp. 365-424.
- BANULS, A.L. 1993. Analyse génétique d'isolats naturels sud-américains de *Leishmania* montrant de possibles phénomènes de recombinaison. — DEA thesis, Université de Montpellier II.
- BARKER, D.C. 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. — *Parasitology*, 99 : S125-S146.
- BERNARDS, A., MICHELS, P.A.M., LINCKE, C.R. & BORST, P. 1983. Growth of chromosome ends in multiplying trypanosomes. — *Nature*, 303 : 592-597.
- BEVERLEY, S.M., ISMACH, R.B. & MCMAHON-PRATT, D. 1987. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. — *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 84 : 484-488.
- BISHOP, R.P. 1987. Chromosome size polymorphism in *Leishmania donovani*. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24 : 263-272.
- BLAINEAU, C., BASTIEN, P. & PAGES, M. 1992. Multiple forms of chromosome I, II and V in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50 : 197-204.
- BORST, P. & HOEIJMAKERS, J.H.J. 1979. Kinetoplast DNA (Review). — *Plasmid*, 2 : 20-40.
- CACERES, A., VILLASECA, P., INGA, R., LOPEZ, M., AREVALO, J. & LLANOS-CUENTAS, A. 1991. *Lutzomyia ayacuchensis* (Diptera : Psychodidae, Phlebotominae), probable vector de la leishmaniasis cutánea andina (uta) en Lucanas y Parinacochas (Ayacucho : Perú). — *In* : Fifth Panamerican Congress of Infectious Diseases, (Lima, Peru), p. II.2.
- CAMERON, M.M. & DAVIES, C.R. 1993. Ecological studies support a key role for aphid honeydew as a nutrient source for sandflies. — *Transactions of the Royal Society of Tropical and Medical Hygiene*, 87 : 363

- CRUZ, A.K., TITUS, R. & BEVERLEY, S.M. 1993. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. — *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **90** : 1599-1603.
- DAVIES, C.R., FERNANDEZ, M., PAZ, L., RONCAL, N. & LLANOS-CUENTAS, A. 1993. *Lutzomyia verrucarum* can transmit *Leishmania peruviana*, the aetiological agent of Andean cutaneous leishmaniasis. — *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87** : 603-606.
- DUJARDIN, J.-C., GAJENDRAN, N., AREVALO, J., LLANOS-CUENTAS, A., GUERRA, H., GOMEZ, J., ARROYO, J., DE DONCKER, S., JACQUET, D., HAMERS, R. & LE RAY, D. 1993a. Karyotype polymorphism and conserved characters in the *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* complex explored with chromosome-derived probes. — *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, **73** : 101-118.
- DUJARDIN, J.-C., LLANOS-CUENTAS, A., CACERES, A., ARANA, M., DUJARDIN, J.-P., GUERRINI, F., GOMEZ, J., ARROYO, J., DE DONCKER, S., JACQUET, D., HAMERS, R., GUERRA, H., LE RAY, D. & AREVALO, J. 1993b. Molecular karyotype variation of *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* evidences geographical populations in Peru along a North-South cline. — *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **87** : 335-347.
- DUJARDIN, J.-C., DE DONCKER, S., LE RAY, D., HAMERS, R. & AREVALO, J. 1994. Size polymorphism of chromosomes bearing gp63 genes in *Leishmania* of the *braziliensis* complex : indication of a rearrangement of the gp63 genes in *L. braziliensis* and *L. peruviana*. — *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **88** : 445-448.
- DUJARDIN, J.-C., DUJARDIN, J.-P., TIBAYRENC, M., TIMPERMAN, G., DE DONCKER, S., JACQUET, D., AREVALO, J., LLANOS-CUENTAS, A., GUERRA, H., BERMUDEZ, H., HAMERS, R. & LE RAY, D. 1995. Karyotype plasticity in Neotropical *Leishmania* : an index for measuring genomic distance among *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) braziliensis* populations. — *Parasitology*, **110** : 21-30.
- ELLIS, J. & CRAMPTON, J. 1988. Characterization of a simple, highly repetitive DNA sequence from the parasite *Leishmania donovani*. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, **29** : 9-18.
- GALINDO, I. & RAMIREZ OCHOA, J.L. 1989. Study of *Leishmania mexicana* electrokaryotype by clamped homogeneous electric field electrophoresis. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, **34** : 245-252.
- GODFREY, D.G. 1979. The zymodemes of trypanosomes. — In : TAYLOR, A.E.R. & MULLER, R. (eds.), Problems in the identification of parasites and their vectors, Symp. Brit. Soc. Parasit., Academic Press, London.
- GRIMALDI, G. & TESH, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World : current concepts and implication for future research. — *Clinical and Microbiological Review*, **6** : 230-250.
- GUERRA, H. 1988. Distribution of *Leishmania* in Peru. — In : WALTON, B.C.,



- WIJEYARATNE, P.M. & MODABBER, F. (eds.), Research on Control Strategies for the Leishmaniasis, IDRC-MR 184e, Ottawa, pp. 135-145.
- GUERRINI, F. 1993. Génétique des populations et phylogénie des *Leishmania* du Nouveau Monde. — Thèse de doctorat, Université de Montpellier II.
- IOVANNISCI, D.M. & BEVERLEY, S.M. 1989. Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, **34** : 177-188.
- KWEIDER, M., LEMESRE, J.L., DARCY, F., KUSNIERZ, J.P., CAPRON, A. & SANTORO, F. 1987. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65 000-dalton surface antigen. — *Journal of Immunology*, **138** : 299-305.
- LAI, E., BIRREN, B.W., HOOD, S.M., SIMON, M.I. & HOOD, L. 1989. Pulsed field gel electrophoresis. — *Biotechniques*, **7** : 34-42.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1970. Leishmaniasis in Brazil : V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. — *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **64** : 654-667.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1979. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. — In : LUMSDEN, W.H.R. & EVANS, D.A. (eds.), Biology of the kinetoplastida, Vol.2, Academic Press, London, New York, pp. 1-116.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. — In : PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. (eds.), The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Vol.1, Academic Press, London, pp. 2-104.
- LAMAS, G. 1982. A preliminary zoogeographical division of Peru, based on butterfly distributions (Lepidoptera, Papilionoidea). — In : PRANCE, T.P. (ed.), Biological Diversification in the Tropics, Columbia University Press, New York, pp. 336-357.
- LEON, W., FOUTS, D.L. & MANNING, J. 1976. Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. — *Nucleic Acids Research*, **5** : 491-504.
- LE RAY, D. 1975. Structures antigéniques de *Trypanosoma brucei* (Protozoa : Kinetoplastida). Analyse immunoélectrophorétique et étude comparative. — *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*, **55** : 158-160.
- LIGHTHALL, G.K. & GIANNINI, S.H. 1992. The chromosomes of *Leishmania*. — *Parasitology Today*, **8** : 192-199.
- LIU, X. & CHANG, K.P. 1992. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. — *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **89** : 4991-4995.

- LLANOS-CUENTAS, E.A. 1991. Tratamiento de leishmaniasis mucosa : análisis de los factores asociados con la repuesta terapéutica a los antimoniales pentavalentes. — Tesis de Doctorado, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.
- LLANOS-CUENTAS, A. & DAVIES, C. 1992. Epidemiological studies on Andean cutaneous leishmaniasis and their significance for designing a control strategy. — *In* : WIJEYARATNE, P., GOODMAN, T. & ESPINAL, C. (eds.), *Leishmaniasis Control Strategies : a critical evaluation of IDRC-supported research*, IDRC-MR322e : 286-303.
- LUMBRERAS, H. & GUERRA, H. 1985. Leishmaniasis in Peru. — *In* : CHANG, K.P. & BRAY, R. (eds.), *Leishmaniasis*, Vol.1, Elsevier, New York, pp. 297-311.
- LUMSDEN, W.H.R. 1974. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. — *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **68** : 74-75.
- MACGREGOR, H.C. 1982. Big chromosomes and speciation among Amphibia. — *In* : DOVER, G.A. & FLAVELL, R.B. (eds.), *Genome evolution*, Academic Press, pp. 325-341.
- MEDINA-ACOSTA, E., BEVERLEY, S.M. & RUSSELL, D.G. 1993. Evolution and expression of the *Leishmania* surface proteinase (gp63) gene locus. — *Infectious Agents and Disease*, **2** : 25-34.
- PAGES, M., BASTIEN, P., VEAS, F., ROSSI, V., BELLIS, M., WINCKER, P., RIOUX, J.A. & ROIZES, G. 1989. Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, **36** : 161-168.
- PEREZ, E., OGUSUKU, E., MOMJE, J. & YOUNG, D.G. 1990. *Lutzomyia* (Dipt. : Psychodidae) de Pillcopeta (CUSCO), nuevos registros para el Perú y descripción de *Lutzomyia deorsa* n. sp. — *Rev. per. Ent.*, **33** : 133-135.
- PEREZ, E., VILLASECA, P., CACERES, A., LOPEZ, M., ZOLESSI, A., CAMPOS, M., GUERRA, H. & LLANOS-CUENTAS, A. 1991. *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana* isolated from the sandfly *Lutzomyia peruensis* (Diptera : Psychodidae) and a sentinel hamster in the Huayllacallan valley, Ancash, Peru. — *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85** : 60.
- PIMENTA, P.F., SARAIVA, E.M.B., ROWTON, E., MODI, G.B., GARRAWAY, L.A., BEVERLEY, S.M., TURCO, S.J. & SACKS, D.L. 1994. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sandflies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. — *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **91** : 9155-9159.
- RAMIREZ, J.L. & GUEVARA, P. 1987. The ribosomal gene spacer as a tool for taxonomy of *Leishmania*. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, **22** : 177-183.

- RIOUX, J.A., LANOTTE, G., PRATLONG, F., MARTINI, A., SERRES, E. & BELMONTE, A. 1986a. Centre international de Cryoconservation, d'Identification enzymatique et d'Etude taxonomique des *Leishmania* (Montpellier, France). Structure et fonctionnement. — *In* : RIOUX, J.A. (ed.), International Symposium on taxonomy and phylogeny of Leishmania, Montpellier, IMEE, pp. 485-502.
- RIOUX, J.A., LANOTTE, G., PETTER, F., DEREURE, J., AKALAY, O., PRATLONG, F., VELEZ, I.D., FIKRI, N.B., MAZOUN, R., DENIAL, M., JARRY, D.M., ZAHAF, A., ASHFORD, R.W., CADI-SOUSSI, M., KILICK-KENDRICK, R., BENMANSOUR, N., MORENO, G., PERIERES, J., GUILVARD, E., ZRIBI, M., KENNOU, M.F., RISPAIL, P., KNECHTLI & SERRES, E. 1986b. Les leishmanioses cutanées du bassin Méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique. L'exemple de trois foyers, tunisien, marocain et français. — *In* : RIOUX, J.A. (ed.), International Symposium on taxonomy and phylogeny of Leishmania, Montpellier, IMEE, pp. 365-395.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. — Cold Spring Laboratory Press, New York, USA.
- SCHNUR, L.F. 1986. Identity and taxonomy within the genus *Leishmania*. — *Insect Science Application*, 7 : 213-223.
- SCHWARTZ, D.C., SAFRAN, N., WELSH, J., HAAS, R., GOLDENBERG, M. & CANTOR, C.R. 1983. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. — *Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology*, 47 : 189-195.
- SERRES, E. & ROUX, M. 1986. Pratique de la classification automatique. L'exemple des *Leishmania*. — *In* : RIOUX, J.A. (ed.), International Symposium on taxonomy and phylogeny of *Leishmania*, Montpellier, IMEE, pp. 27-40.
- SHAW, J.J. & LAINSON, R. 1987. Ecology and epidemiology : New World. — *In* : PETERS, W. & KILICK-KENDRICK, R. (eds.), The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Vol. 1, Academic Press, London, pp. 291-364.
- SOCCOL, V.T. 1993. Les *Leishmania* du Nouveau Monde. Analyse enzymatique. Démarche progressive phénétique-cladistique. Relation phylogénétique avec les *Leishmania* de l'Ancien Monde. — Thèse de doctorat. Université de Montpellier I, Fac.de Médecine.
- TIBAYRENC, M. & AYALA, F.J. 1987. Forte corrélation entre classification isoenzymatique et variabilité de l'ADN kinétoplastique chez *Trypanosoma cruzi*. — *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 304, Série III : 89-92.
- TIBAYRENC, M., KJELLEBERG, F. & 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. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **87** : 2414-2418.
- TIBAYRENC, M., NEUBAUER, K., BARNABE, C., GUERRINI, F., SKARECKY, D. & AYALA, F.J. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa : parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. — *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **90** : 1335-1339.
- TOBIE, E.J., VON BRAND, T. & MEHLMAN, B. 1950. Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*. — *Journal of Parasitology*, **36** : 48-54.
- VAN DER PLOEG, L.H.T., SCHWARTZ, D.C., CANTOR, C.R. & BORST, P. 1984. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. — *Cell*, **37** : 77-84.
- VAN EYS, G.J.J.M., SCHOONE, G.J., LIGTHART, G.S., ALVAR, J., EVANS, D.A. & TERPSTRA, W.J. 1989. Identification of "Old World" *Leishmania* by DNA recombinant probes. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, **34** : 53-62.
- VAN EYS, G.J.J.M., SCHOONE, G.J., KROON, N.C.M. & EBELING, S.B. 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. — *Molecular and Biochemical Parasitology*, **51** : 133-142.
- VICTOIR, K., DUJARDIN, J.-C., DE DONCKER, S., BARKER, D.C., AREVALO, J.A., HAMERS, R. & LE RAY, D. 1995. Plasticity of gp63 gene organization in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana*. — *Parasitology*, **111** : 265-273.
- VILLASECA, P., LLANOS-CUENTAS, A., PEREZ, E. & DAVIES, C.R. 1993. A comparative field study of the relative importance of *Lutzomyia peruensis* and *Lutzomyia verrucarum* as vectors of cutaneous Leishmaniasis in the Peruvian Andes. — *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **49** : 260-269.
- WALTON, B.C. 1987. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. — In : PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. (eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol.1, Academic Press, London, pp. 637-664.
- WARD, R.D. 1985. Vector biology and control. — In : CHANG, K.P. & BRAY, R.S. (eds.), *Leishmaniasis*, Elsevier, New York, pp. 199-212.
- WILSON, A.C., SARICH, V.M. & MAXSON, L.R. 1974. The importance of gene rearrangement in evolution : evidence from studies on rates of chromosomal protein and anatomical evolution. — *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **71** : 3028-3030.

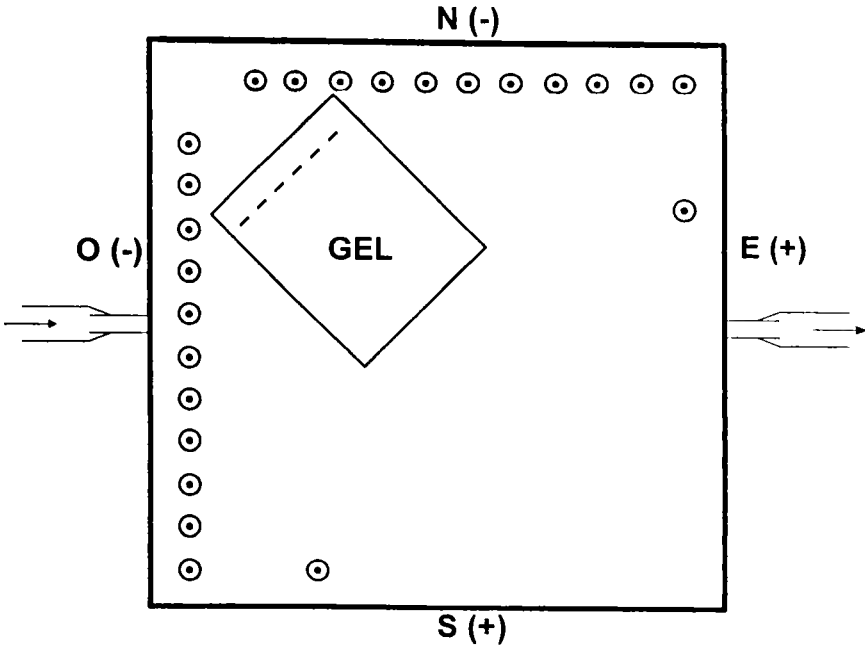


## ANNEXE I

### Electrophorèse en champ pulsé

L'électrophorèse en champ pulsé (PFG) a été développée en 1983 (SCHWARTZ *et al.*) et depuis, diverses modifications techniques lui ont été apportées. Dans ce travail, nous avons utilisé la formule OFAGE [Orthogonal Field Alternated Gel Electrophoresis (CARLE & OLSON 1984)] et utilisé une cuve construite et mise au point à la VUB, Sint-Genesius-Rode.

La cuve a une dimension de 25 × 25 cm et contient deux paires d'électrodes. Par convention, chaque électrode est nommée par un point cardinal. Les électrodes Nord et Ouest sont des cathodes et sont chacune constituées d'une dizaine de fils de Platine reliés entre eux par l'intermédiaire de diodes. Les électrodes Sud et Est sont chacune constituées d'un seul fil de Platine. Les champs électriques sont alternativement appliqués entre le Nord et le Sud d'une part, et l'Ouest et l'Est d'autre part, grâce à une double minuterie reliée



à une source d'alimentation électrique. Ceci a deux conséquences. Premièrement, la constitution différente des deux électrodes de chaque paire entraîne un champ électrique inhomogène ; ceci permet aux grosses molécules d'ADN constituant les chromosomes de s'étirer et de traverser la matrice d'agarose utilisée pour leur migration. Deuxièmement, l'activation alternée force les molécules d'ADN à s'étirer pour migrer dans un sens, puis à se contracter pour s'étirer dans un axe orthogonal et migrer dans le second sens. Le temps d'activation de chaque paire d'électrodes (pulse) détermine la taille des chromosomes qui seront résolus. Si le pulse est bas (45 secondes dans notre expérience), seuls les petits chromosomes ont le temps de se contracter et de migrer dans le sens orthogonal ; les grands chromosomes restent ensemble et migrent comme une seule bande. L'utilisation d'un pulse plus élevé permet de les séparer à leur tour.

L'électrophorèse est effectuée dans un tampon TBE  $0,5 \times (0,045 \text{ M Tris}, 0,045 \text{ acide borique}, 0,001 \text{ M EDTA})$  maintenu à une température de  $10-15 \text{ }^\circ\text{C}$  grâce à la recirculation du tampon dans un bain réfrigéré ; une basse température est critique pour une bonne résolution des chromosomes. L'ADN préparé spécialement (voir plus bas) est déposé dans un gel d'agarose (1-1,5 %) de  $10 \times 12 \times 0,5 \text{ cm}$  coulé sur une fine plaque de verre : l'épaisseur de la plaque ainsi que du gel sont cruciales pour une bonne réfrigération dans le gel, donc pour la résolution des chromosomes. Un voltage de  $15 \text{ V/cm}$  est appliqué durant 24 heures, et 3 pulses sont généralement utilisés pour la résolution de l'entière du caryotype leishmanien (45,65 et 115 s). Après électrophorèse, le gel est coloré au bromure d'éthidium ( $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) et exposé à des UV pour être lu.

L'ADN pour l'électrophorèse en champ pulsé doit être préparé de façon particulière afin de préserver l'intégrité des chromosomes. Les parasites sont lavés soigneusement dans une solution saline, puis centrifugés. Le culot est resuspendu afin de contenir  $66.10^6$  parasites/ $50 \text{ } \mu\text{l}$  de solution saline. Cette suspension est mélangée à un volume égal d'agarose (1 %) à faible point de fusion maintenu à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , puis coulée dans des petits moules parallépipédiques de  $100 \text{ } \mu\text{l}$ . Après solidification, les petits blocs d'agarose sont démoulés et incubés durant 48 heures dans une solution de lyse ( $0,5 \text{ M EDTA pH } 9,5$ , 1 % N-laurosarcosinate de Sodium,  $2 \text{ mg/ml}$  ProtéinaseK) à une température de  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  : grâce à la structure de l'agarose, l'ADN est immobilisé après la lyse protéique. Les blocs sont ensuite conservés durant des années à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pour l'électrophorèse, on découpe un tiers de chaque bloc ( $22.10^6$  parasites) et on le dépose dans un puits fait dans le gel : aucun pipetage n'est effectué, donc l'intégrité des chromosomes est respectée.

## ANNEXE 2

### Stocks utilisés dans ce travail

Donneurs : P. Desjeux (a), D. Evans (b), J. Arevalo (c), H. Bermudez (d), J.J. Shaw (e), M. Chance (f), G. Van Eys (g), J.P. Dedet (h), J.A. Rioux (i.), P.C. Garnham (j). Unités biogéographiques (BGU\*, uniquement pour le Pérou) selon Lamas ; IN : Inambari, CH : Chanchamayo, SA : Santa Ana, HN : Huanuco, HL : Huallaga, HB : Huancabamba, SUN : Surco-Nord, SUC : Surco-Centre, SUS : Surco-Sud, PO : Porculla. ITMAP : code interne du laboratoire de Protozoologie de l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers.

Code	ITMAP	Origine géographique	Donneur	BGU*
<b>Sous-genre <i>Viannia</i></b>				
<i>L. braziliensis</i>				
<b>Brésil</b>				
MHOM/BR/75/M2904	2037	Para, Carajas	a	
MHOM/BR/75/M2903	2060	Para, Carajas	b	
MHOM/BR/84/LTB300	2056	Bahia, Tres Bracos	b	
<b>Bolivie</b>				
MHOM/BO/92/CUM005	2411	Alto Beni	d	
MHOM/BO/92/CUM006	2418	Cochabamba, Carrasco tropical	d	
<b>Pérou</b>				
MHOM/PE/84/LC01	2123	Madre de Dios, Iberia	c	IN
MHOM/PE/84/LC03	2122	Madre de Dios, Mazuco	c	IN
MHOM/PE/84/LC53	2117	Madre de Dios, Río Colorado	c	IN
MHOM/PE/90/LH1013	2353	La Convención, Quillabamba	c	CH/SA
MHOM/PE/89/LH754	2340	La Convención, Santa Ana	c	CH/SA
MHOM/PE/90/LH852	2339	La Convención, Echarate	c	CH/SA
MHOM/PE/91/LC1409	2359	Huanuco, Huancapallac	c	HN/HL
MHOM/PE/91/LC1412	2364	"	c	HN/HL
MHOM/PE/91/LC1417	2360	"	c	HN/HL
<i>L. peruviana</i>				
MHOM/PE/90/HB22	2329	Huancabamba, Huancabamba	c	HB
MHOM/PE/90/HB31	2330	Huancabamba, Huancabamba	c	HB
MHOM/PE/90/HB39	2316	Huancabamba, Sondorillo	c	HB
MHOM/PE/90/HB44	2317	Huancabamba, Sondorillo	c	HB
MHOM/PE/90/HB55	2318	Huancabamba, Sondor	c	HB
MHOM/PE/90/HB56	2319	Huancabamba, Sondor	c	HB



Code	ITMAP	Origine géographique	Donneur	BGU*
MHOM/PE/90/HB67	2320	Huancabamba, Sondor	c	HB
MHOM/PE/90/HB83	2321	Huancabamba, Canchaque	c	HB
MHOM/PE/90/HB86	2322	Huancabamba, Faique	c	HB
MHOM/PE/89/LC900	2323	Huancabamba, Sondorillo	c	HB
MHOM/PE/90/LC443	2298	Bolognesi, Huayllacayan	c	SUN
MHOM/PE/88/LC292	2297	Bolognesi, Huayllacayan	c	SUN
MHOM/PE/90/LC468	2299	Bolognesi, Huayllacayan	c	SUN
MHOM/PE/90/LC447	2296	Bolognesi, Raquia	c	SUN
MHOM/PE/84/LH115	2294	Recuay, Pararin	c	SUN
MHOM/PE/89/LH741	2327	Recuay, Pararin	c	SUN
MHOM/PE/84/LC26	2125	Bolognesi, Huayllacayan	c	SUN
MHOM/PE/88/LC272	2328	Bolognesi, Raymondi	c	SUN
MHOM/PE/90/LC423	2300	Bolognesi, Huayllacayan	c	SUN
MHOM/PE/90/LC446	2301	Bolognesi, Huayllacayan	c	SUN
MHOM/PE/90/LC436	2395	Bolognesi, Huayllacayan	c	SUN
MHOM/PE/84/LH78	2129	Huaylas, Caraz	c	SUC
MHOM/PE/89/LH696	2345	Huaral, Sunvilca	c	SUC
MHOM/PE/90/LH807	2344	Canta, San Buenaventura	c	SUC
MHOM/PE/90/LH937	2394	Canta, Huamantanga	c	SUC
MHOM/PE/90/LH911	2313	Huaral, Sumbilca	c	SUC
MHOM/PE/89/LH760	2326	Canta, Atavillosbajo	c	SUC
MHOM/PE/90/LH827	2312	Canta, Lampiane	c	SUC
MHOM/PE/90/LH925	2311	Canta, Sanbuenaventura	c	SUC
MHOM/PE/91/LC1015	2348	Canta, Cachaqui	c	SUC
MHOM/PE/76/SL2	2106	Huarochoiri, Santa Eulalia	c	SUC
MHOM/PE/00/LC106	2127	Huarochoiri, Santa Eulalia	c	SUC
MHOM/PE/76/D8	2107	Huarochoiri, Santa Eulalia	c	SUC
MHOM/PE/76/SL5	2109	Huarochoiri, Santa Eulalia	c	SUC
MHOM/PE/76/SL3	2104	Huarochoiri, Santa Eulalia	c	SUC
MHOM/PE/90/LCA01	2314	Lucanas, Sancos	c	SUS
MHOM/PE/90/LCA04	2315	Lucanas, Sancos	c	SUS
MHOM/PE/90/LCA05	2309	Lucanas, Sancos	c	SUS
MHOM/PE/90/LCA06	2351	Lucanas, Sancos	c	SUS
MHOM/PE/90/LCA08	2306	Lucanas, Sancos	c	SUS
MHOM/PE/90/LCA09	2346	Lucanas, Sancos	c	SUS
MHOM/PE/90/LCA11	2310	Lucanas, Sancos	c	SUS
MHOM/PE/90/LH249	2307	Lucanas, Sancos	c	SUS
IAYA/PE/90/La36	2337	Parinacochas, Pullo	c	SUS
IAYA/PE/90/La78	2305	Parinacochas, Pullo	c	SUS
MHOM/PE/91/LC1407	2358	Huancapallac, Limapampa	c	HN/HL
MHOM/PE/91/LC1408	2367	"	c	HN/HL
MHOM/PE/91/LC1418	2370	"	c	HN/HL
MHOM/PE/91/LC1419	2371	Huancapallac, Puyac	c	HN/HL
<i>L. guyanensis</i>				
<b>Brésil</b>				
MHOM/BR/75/M4147	2053	Para, Monte Dorado	b	
MHOM/BR/69/M1142	2052	Para	b	

Code	ITMAP	Origine géographique	Donneur	BGU*
MHOM/BR/78/M5378	1868	Para, Monte Dorado	e	
MCHO/BR/80/M6200	2051	Para	b	
<b>Surinam</b>				
MHOM/SR/87/WAR	2150	Paramaribo	g	
MHOM/SR/87/KLEI	2147	Paramaribo	g	
<b>Guyane Française</b>				
MHOM/GF/85/LEM669	2153		i	
MHOM/GF/84/CAYH166	2144		h	
<i>L. panamensis</i>				
<b>Panama</b>				
MHOM/PA/67/M4037	2196		b	
MCHO/PA/00/M4039	2187		b	
Sous-genre <i>Leishmania</i>				
<i>L. amazonensis</i>				
<b>Brésil</b>				
MPRO/BR/77/M1845	1809	Para	f	
<i>L. mexicana</i>				
<b>Belize</b>				
MNYC/BZ/62/M379	2167		j	
MNYC/BZ/62/M379	2048		b	
<i>L. garnhami</i>				
<b>Venezuela</b>				
MHOM/VE/76/JAP78	2049		e	
<i>L. aristedesi</i>				
<b>Panama</b>				
MORY/PA/68/GML3	2062	Sasardi Darien	e	

## ANNEXE 3

### **Production du matériel parasitologique**

Les stocks parasitologiques ont été cultivés sur de l'agar-sang (TOBIE *et al.* 1950) ou du GLSH (LE RAY 1975), et généralement récoltés en phase logarithmique précoce (jour 2).

Un mode de production spécifique a été développé dans le cadre de l'étude des populations péruviennes. Pour chaque isolat, un premier stabilat (pour cryopréservation) a été effectué dans le pays d'origine. Chaque isolat a ensuite été transféré dans notre laboratoire où trois stabilats successifs ont été réalisés pour cryopréservation : Sb1 = réception (à proximité de l'isolement) ; Sb2 = isolat adapté en culture ; Sb3 = au moment de la production du matériel pour caractérisation. Etant donné que ce matériel non cloné était destiné à la caractérisation par différentes méthodes (analyse isoenzymatique et PFG), et afin d'éviter des variations populationnelles, le matériel a été produit en un seul lot et préparé ensuite selon les besoins spécifiques de chaque méthode. Toutes ces étapes sont résumées dans un historique détaillé, puis archivées.



