

Écologie des Leishmanioses dans le sud de la France

16. Contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne.

A propos de 55 souches isolées en Cévennes, Côte d'Azur,
Corse et Tunisie.

par **R. MAAZOUN** (1), **G. LANOTTE** (1), **N. PASTEUR** (1),
J.-A. RIOUX (1), **M. F. KENNOU** (2) et **F. PRATLONG** (1)

(coll. technique A. Martini-Dumas et N. Bayar)

(1) *Laboratoire d'Ecologie médicale et Pathologie parasitaire (P^r J.-A. Rioux),
Faculté de Médecine, 34000 Montpellier.*

(2) *Laboratoire de Parasitologie, Institut Pasteur de Tunis (P^r A. Chadli), Tunisie.*

RESUME. Poursuivant l'analyse structurale du foyer cévenol de leishmaniose viscérale, les auteurs procèdent à l'étude enzymatique de 47 souches isolées de cas humains (7 enfants, 7 adultes) et canins (33). Huit systèmes, liés au cycle respiratoire, sont éprouvés selon la technique de l'électrophorèse en gel d'amidon : PGM (E.C.2.7.5.1) ; PGI (E.C.5.3.1.9) ; G-6-PDH (E.C.1.1.1.49) ; 6-PGDH (E.C.1.1.1.44) ; IDH (E.C.1.1.1.42) ; MDH (E.C.1.1.1.37) ; ME (E.C.1.1.1.40) ; GOT (E.C.2.6.1.1),

Les zymogrammes obtenus sont semblables pour la totalité des échantillons. Une souche, isolée d'un cas de leishmaniose cutanéomuqueuse, entre également dans ce groupe. En outre, aucune différence n'est constatée entre les échantillons cévenols et ceux provenant de souches viscérales canines d'origine niçoise, corse et tunisienne. De même, s'avère identique le zymogramme d'une souche isolée d'une leishmaniose viscérale du Honduras (*Leishmania chagasi* Cunha et Chagas, 1937).

Par contre, une divergence est notée avec les zymodèmes correspondant aux formes viscérales indiennes et irakiennes (2 systèmes/8). Les arguments en faveur de

Accepté le 14 août 1980.

l'individualité et de l'homogénéité du « macrofoyer » zoonotique méditerranéen se trouvent ainsi renforcés. Dès lors, pour ce foyer, le binôme *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 est recommandé à la place de *Leishmania donovani* (Laveran et Mesnil, 1903), pour nommer le parasite responsable des formes viscérales, tant humaines que canines, et de certaines formes muqueuses humaines. Par voie de conséquence, *Leishmania chagasi* deviendrait synonyme de *Leishmania infantum*.

Ecology of leishmaniasis in the south of France. — 16. A contribution to the chemotaxonomy of parasites of Mediterranean visceral leishmaniasis. Comprising 55 strains isolated in the Cévennes, Côte d'Azur, Corsica and Tunisia.

SUMMARY. *In an analysis of the structure of the Cévennes focus of visceral leishmaniasis, we have studied isoenzymes of 47 strains isolated from men (7 children, 7 adults) and dogs (33). Eight enzymes of the Krebs and pentoses cycles were examined by electrophoresis on starch gel; these were PGM (E.C.2.7.5.1); PGI (E.C.5.3.1.9); G-6-PDH (E.C.1.1.1.49); 6-PGDH (E.C.1.1.1.44); IDH (E.C.1.1.1.42); MDH (E.C.1.1.1.37); ME (E.C.1.1.1.40); GOT (E.C.2.6.1.1).*

*Zymograms of all enzymes were the same for all samples tested. A strain from a case of muco-cutaneous leishmaniasis also fell into this group. In addition, there were no differences detected between strains from the Cévennes and others from dogs with visceral leishmaniasis originating from Nice, Corsica and Tunisia. Similarly, zymograms of a strain from a case of visceral leishmaniasis in Honduras (*Leishmania chagasi* Cunha and Chagas, 1937) were found to be indistinguishable from those of Mediterranean strains.*

*In contrast, there were differences between Mediterranean strains and strains isolated from human cases of visceral leishmaniasis in India and Iraq (2/8 systems). This supports the notion that the Mediterranean zoonotic « macrofocus » is homogeneous and different from other foci. In this focus, therefore, the binominal *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 is recommended in place of *Leishmania donovani* (Laveran and Mesnil, 1903) as the name of the parasite causing the visceral form of the disease, whether in dog or man, and certain muco-cutaneous forms of man in the Mediterranean Basin. It follows, therefore, that *Leishmania chagasi* becomes a synonym of *Leishmania infantum*.*

Introduction

Depuis le début du siècle, les problèmes soulevés par la taxonomie des Leishmanies n'ont cessé de préoccuper les chercheurs. Les critères d'identification, variables selon

les auteurs, ont tour à tour porté sur la morphologie photonique et électronique (P. C. C. Garnham et D. J. Lewis, 1959 ; S. Adler, 1964 ; J. A. Manukian et V. M. Safyanova, 1968 ; J. J. Shaw et R. Lainson, 1976 ; J. V. Scorza et coll., 1979), le pouvoir pathogène expérimental (G. Blanc et J. Caminopetros, 1930 ; R. Lainson et J. J. Shaw, 1970 ; O. I. Kellina, 1973 ; D. J. Bradley, 1974), le cycle intravectériel (S. Adler et O. Theodor, 1927 ; M. Hertig et E. Mc Connel, 1963 et R. Killick-Kendrick et coll., 1975 et 1977), l'adaptation du parasite aux milieux de culture (R. Lainson et J. J. Shaw, 1970) ou les types de réponses immunologiques (agglutination directe : G. di Cristina, 1911, S. L. Chang et W. O. Negherbon, 1947, S. Adler, 1964 ; hémagglutination passive : R. S. Bray et A. D. M. Bryceson, 1969, R. W. Ashford et coll., 1973 ; facteur excrété : L. F. Schnur et coll., 1972, J. E. Decker et P. M. Daggett, 1974 ; précipitation et immunoélectrophorèse : D. Le Ray et coll., 1977 ; test à la ferritine : V. M. Safyanova et E. I. Aliev, 1973). Malgré le nombre et la qualité des travaux poursuivis, aucun de ces critères pris isolément, n'a pu malheureusement être utilisé pour élaborer une classification rationnelle.

Une voie nouvelle, basée sur l'utilisation de certains caractères biochimiques, paraît cependant prometteuse, encore que les méthodes utilisées soient d'inégale valeur. Ainsi, l'analyse des séquences-bases de l'ADN, idéale pour individualiser les groupes systématiques, est actuellement obérée par d'importantes difficultés techniques. Il en est de même pour l'étude de la densité ou de la structure des fractions de l'ADN (ultracentrifugation analytique : M. L. Chance et coll., 1974 ; restriction par endonucléase : L. Simpson et B. Hyman, 1976) qui demeure un corps de méthodes réservé aux spécialistes.

Plus accessible et tout aussi rigoureuse, s'avère l'analyse électrophorétique des isoenzymes. Appliquée récemment aux Protozoaires (*Entamoeba histolytica* : F. Montalvo et R. E. Reeves, 1968 ; *Toxoplasma gondii* : M. M. Bloomfield et J. S. Remington, 1970 ; *Plasmodium berghei* et *P. vinckei* : R. Carter 1973), cette technique a pu être adaptée sans difficulté aux Trypanosomatidae (P. J. Gardener et R. E. Howells, 1972 ; V. Kilgour et D. G. Godfrey, 1973 ; F. Ebert, 1973 ; W. Peters et coll., 1973 ; V. Kilgour et coll., 1974). En matière de Leishmanies, P. J. Gardener et coll., 1974 ont utilisé la mobilité électrophorétique de la MDH, complétée par la densité de l'ADN-K et de l'ADN-N, parvenant à individualiser treize groupes : MDH₀ à MDH₅, MDH₇ à MDH₁₃. A leur suite, plusieurs auteurs ont développé la méthode en l'appliquant à l'étude des foyers d'infection et des cycles épidémiologiques (M. Al Taqi et D. A. Evans, 1978 ; M. B. Rassam et coll., 1979 ; T. I. Aljeboori et D. A. Evans, 1980 *a* et *b* ; M. A. Miles et coll., 1980).

La présente note a précisément pour but d'exposer les résultats d'une semblable analyse, appliquée à la leishmaniose viscérale en Cévennes. A travers l'identification biochimique de l'agent pathogène, il s'agit essentiellement d'authentifier le transfert parasitaire Chien → Homme et, par là même, de confirmer l'unicité de la métazoose.

Matériel et Méthode

40 souches, isolées de ganglions de Chiens atteints de leishmaniose viscérale (33 cévenoles, 4 corses, 2 tunisiennes et une niçoise) et 17 souches, isolées chez l'Homme (8 enfants et 9 adultes dont une cutanéomuqueuse), ont été analysées. 12 souches, préalablement identifiées, ont servi de références (P. J. Gardener et coll., 1974 ; M. L. Chance et coll., 1977 ; M. Al Taqi et D. A. Evans, 1978) (tableau I).

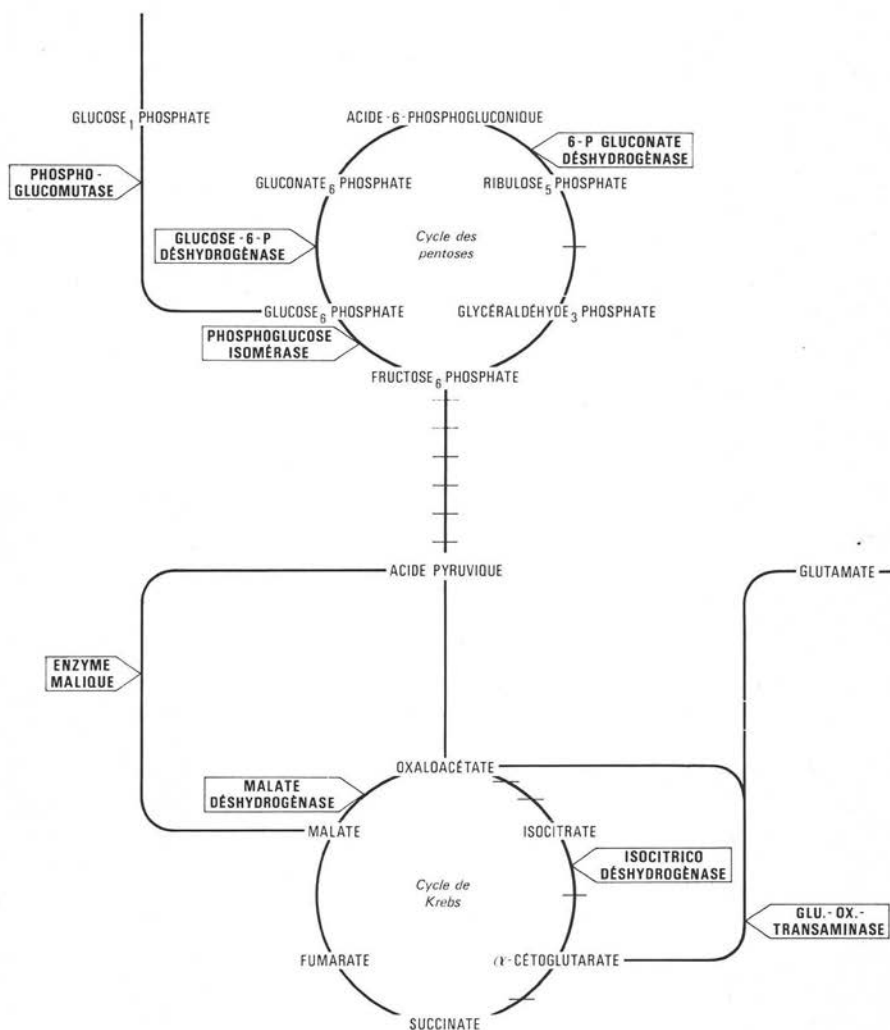


Fig. 1. Cycle énergétique. Place des huit systèmes enzymatiques étudiés (encadrés).

Tableau I. Origines, déterminations cliniques et hôtes vertébrés des 69 souches analysées

Souches	Origines	Déterminations cliniques	Hôtes
LEM ⁽¹⁾ 41, 70, 73, 75, 100, 101, 108	FRANCE Cévennes	L. viscérales	Homme (enfant)
LEM 51, 58, 59, 69, 71, 76, 140	FRANCE Cévennes	L. viscérales	Homme (adulte)
LEM 42	FRANCE Cévennes	L. cutanéomuqueuse	Homme (adulte)
LEM 35, 48, 49, 50, 53, 54, 55, 57, 59, 60, 63, 64, 65, 68, 72, 79, 80, 81, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107	FRANCE Cévennes	L. viscérales	Chien
LEM 97	FRANCE Côte d'Azur	L. viscérale	Homme (adulte)
LEM 96	FRANCE Côte d'Azur	L. viscérale	Chien
LEM 40, 52, 66, 67	FRANCE Corse	L. viscérales	Chien
LEM 77, 78	TUNISIE	L. viscérales	Chien
LEM 74	HONDURAS	L. viscérale	Homme (enfant)
LEM 138, 139 ⁽²⁾	INDE	L. viscérales	Homme (adulte)
LEM 82 ⁽³⁾	IRAK	L. viscérale	Homme (enfant)
LEM 129 ⁽⁴⁾	URSS	L. viscérale	Rongeur
LEM 131, 134 ⁽⁴⁾	URSS	L. cutanées	Homme (adulte)
LEM 128, 132, 133 ⁽⁴⁾	LIBYE	L. cutanées	Homme (adulte)
LEM 84 ⁽⁵⁾	IRAK	L. viscérale	Rat (<i>Rattus rattus</i>)
LEM 135, 137 ⁽⁵⁾	IRAK	L. cutanées	Homme (adulte)

1) LEM : souches conservées dans la cryobanque du Laboratoire d'Écologie Médicale
Faculté de Médecine - Montpellier

2) *L. donovani* (= Lv 699 et Lv 700)

3) *L. donovani* spp (= l. f. 3)

4) *L. major* (= Lv 39, Lv 250, Lv 252, Lv 321, Lv 310 et Lv 316)

5) *L. tropica* (= IBF, Lv 556 et Lv 142)

22 systèmes enzymatiques ont été éprouvés, parmi lesquels 8, appartenant au cycle énergétique (fig. 1), ont été retenus (1), à savoir :

— la *Phosphoglucumutase* (PGM) E.C.2.7.5.1 transforme le Glucose-1-Phosphate en Glucose-6-Phosphate ;

— la *Phosphoglucose isomérase* (PGI) E.C.5.3.1.9 isomérisé le Fructose-6-Phosphate en Glucose-6-Phosphate et inversement ;

— la *Glucose-6-Phosphate déshydrogénase* (G-6-PDH) E.C.1.1.1.49 oxyde le Glucose-6-Phosphate en Gluconolactone-6-Phosphate (voie des pentoses) ;

— la *6-Phosphogluconate déshydrogénase* (6-PGDH) E.C.1.1.1.44 transforme le Gluconate-6-Phosphate en composé instable donnant le Ribulose-5-Phosphate (voie des pentoses) ;

— l'*Isocitrate déshydrogénase* (IDH) E.C.1.1.1.42 catalyse l'oxydation de l'isocitrate en oxalosuccinate ;

— la *Malate déshydrogénase* (MDH) E.C.1.1.1.37 transforme l'acide malique en acide oxaloacétique (plaque tournante du cycle de Krebs) ;

— l'*Enzyme malique* ou *décarboxylase malique* (ME) E.C.1.1.1.40 catalyse la synthèse de l'acide malique à partir de l'acide pyruvique (Glucogénèse) ;

— la *Glutamate oxaloacétate transaminase* (GOT) E.C.2.6.1.1 transfère le radical aminé de l'acide glutamique à l'acide oxaloacétique.

Les extraits protéiniques ont été préparés selon le protocole suivant : les souches, conservées dans l'azote liquide, sont décongelées et repiquées sur milieu Cœur-Cerveau-Sang (CCS), d'abord en tubes puis en boîtes de Roux, pour obtenir une « culture de masse » (J.-A. Rioux et coll., 1970). Les parasites, lavés dans quatre bains d'eau salée isotonique, puis concentrés par centrifugation, sont conditionnés sous forme de perles de 200 μ l (2) par congélation dans l'azote liquide puis conservés à -80°C . Au moment de l'emploi, le cryostabilat est décongelé et maintenu à $+4^{\circ}\text{C}$. La lyse des parasites est réalisée par l'action surfactive de 250 μ l de Triton-X-100 à 5 %. Le lysat est centrifugé en atmosphère réfrigérée, à 10 000 t/mn (Janetzki K-24) pendant 10 minutes. Le surnageant représente l'extrait protéinique directement utilisable.

Le support d'électrophorèse est constitué par un gel d'amidon de 400 ml coulé en couche épaisse de 1 cm (12 g d'amidon hydrolysé pour 100 ml de tampon citrate ou maléate) (tableaux II et III).

Les gels destinés à la révélation de la malate déshydrogénase contiennent, en outre, 40 mg de NAD et 100 mg de Phosphate mono et disodique.

Au moment de la confection du gel, l'adjonction de 40 mg de coenzyme (NAD ou NADP) augmente l'intensité des colorations ultérieures.

(1) Ces systèmes ont été retenus pour des raisons pratiques. Deux solutions tampons seulement ont été utilisées : tris-citrate pH 9,4 pour la MDH, tris-maléate-EDTA pH 7,4 pour les autres enzymes.

(2) Promastigotes et NaCl 9% H_2O : V/V.

Tableau II. Tampon tris-citrate, pH 9,4

	Gels	Electrodes
Tris	0,009 M	0,13 M
Citrate	0,003 M	0,043 M

Tableau III. Tampon tris-maléate - EDTA, pH 7,4

	Gels	Electrodes
Tris	0,01 M	0,1 M
Acide maléique	0,01 M	0,1 M
EDTA	0,001 M	0,01 M
MgCl ₂	0,001 M	0,001 M

L'électrophorèse proprement dite, la révélation enzymatique et la lecture sont effectuées comme suit : des rectangles calibrés de papiers Whatman n° 3, imbibés de l'extrait protéinique sont déposés verticalement au sein du gel, à l'aide d'un peigne à dents plates, espacées de 5 mm. La surveillance du front de progression est assurée par du bleu de bromophénol. L'opération est réalisée en enceinte à + 4 °C. Chaque gel, traversé par 100 mA, est soumis à une différence de potentiel de 100 V. La durée de migration est de 5 heures pour les systèmes G-6-PDH, 6-PGDH, IDH et ME et de 6 heures pour les systèmes PGM, PGI, MDH et GOT. Après électrophorèse, les gels sont découpés en quatre tranches. La révélation (tableau IV) a lieu à l'obscurité. Elle dure environ une demi-heure. Les gels sont ensuite lavés à l'eau distillée puis fixés par une solution alcoolique d'acide acétique (1). La mobilité électrophorétique de chaque isoenzyme est calculée par rapport à un marqueur, en l'occurrence la souche LEM 75, isolée en Cévennes d'une leishmaniose viscérale infantile. Quelle que soit la distance (d) parcourue par l'isoenzyme LEM 75, on pose $d_{75} = 1$. La mobilité μ_{75} est alors égale à $\frac{d_{75}}{d_{75}} 100$ et la mobilité relative d'un échantillon quelconque (x) est donnée par le rapport $\mu_x = \frac{d_x}{d_{75}} 100$.

(1) Alcool 1 000 ml ; acide acétique : 400 ml ; glycérol : 200 ml ; eau distillée : 400 ml.

Tableau IV. Révélation enzymatique : conditions opératoires

Enzymes	Substrats	Coenzymes	Additifs	Révélateurs	Tampon de révélation (tris HCl 0,2M) pH 8,0	pH final	Températures de révélation	Solution d'Agar à 2%
PGM (E.C. 2.7.5.1.)	Glucose-1-P 300mg	NAD 10mg	G-6-PDH 20u MgCl ₂ 10mg	NBT 10mg PMS 10mg	10ml	8,0	25°C	5ml
PGI (E.C. 5.3.1.9.)	Fructose-6-P 10mg	NAD 10mg	G-6-PDH 20u MgCl ₂ 10mg	NBT 10mg PMS 10mg	10ml	8,0	4°C	5ml
G-6-PDH (E.C. 1.1.1.49.)	Glucose-6-P 20mg	NADP 10mg	EDTA 25mg	NBT 10mg PMS 10mg	10ml	8,0	25°C	5ml
6-PGDH (E.C. 1.1.1.44.)	Ac. 6-P Gluconique 40mg	NADP 10mg	MgCl ₂ 10mg	NBT 10mg PMS 10mg	10ml	8,0	25°C	5ml
IDH (E.C. 1.1.1.42.)	Ac. Isocitr. 120mg	NADP 10mg	MnCl ₂ 3mg	NBT 10mg PMS 10mg	8ml	8,0	37°C	5ml
MDH (E.C. 1.1.1.37.)	Malate Na 600mg	NAD 10mg	•	NBT 10mg PMS 10mg	8ml	8,0	37°C	5ml
ME (E.C. 1.1.1.40.)	Malate Na 600mg	NADP 10mg	•	NBT 10mg PMS 10mg	8ml	7,5	25°C	5ml
GOT (E.C. 2.6.1.1.)	Cétoglutarate 100mg Ac. Asp. 200mg	Vit. PP 10mg	•	NBT 10mg Fast Blue B.B. 150mg	40ml	7,5	20°C	•

Résultats et conclusion

La totalité des souches viscérales, humaines et canines, provenant du foyer cévenol présentent la même mobilité électrophorétique. Cette constatation s'étend aux souches canines, niçoises, corses et tunisiennes. Identique s'avère également le zymogramme de la souche LEM 42, isolée d'une lésion cutanéomuqueuse chez un sujet n'ayant jamais quitté les Cévennes (J.-A. Rioux et coll., 1980) ainsi que celui de la souche LEM 74 issue d'une leishmaniose viscérale du Honduras. (fig. 2 a et b ; fig. 3 a, b et c).

Leishmania donovani (Laveran et Mesnil, 1903) isolée de Kala-azar indiens (LEM 138 et LEM 139) se distingue des échantillons cévenols par deux systèmes (6-PGDH et GOT). Le zymodème LEM 82, provenant d'une leishmaniose viscérale irakienne, diffère également par deux systèmes (PGI et GOT).

Leishmania major Yakimoff et Schokhor, 1914 d'origine russe (LEM 131, LEM 134 et LEM 129) et libyenne (LEM 128, LEM 132 et LEM 133) possède un zymogramme différent pour six systèmes (PGM, PGI, G-6-PDH, 6-PGDH, MDH et ME).

Leishmania tropica (Wright, 1903) de provenance irakienne (LEM 84, LEM 135 et LEM 137) est également différente, par cinq systèmes enzymatiques (MDH, PGI, G-6-PDH, 6-PGDH, ME et GOT).

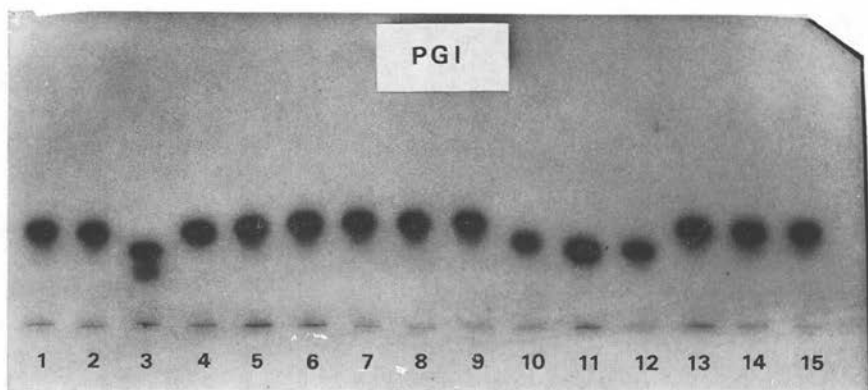
*
**

Ainsi se trouvent confirmés les résultats des études réalisées en Cévennes (J.-A. Rioux et coll., 1969, 1972 a et b, 1973 et 1979 ; G. Lanotte, 1975 ; R. Killick-Kendrick 1979) sur les différents éléments du cycle épidémiologique. Les parasites, isolés chez l'Homme (enfant et adulte) et chez le Chien, sont identiques et ce, malgré d'importantes différences cliniques et évolutives (G. Lanotte et coll., 1979 et 1980). De même, l'agent de la leishmaniose cutanéomuqueuse autochtone peut être rattaché au « complexe pathogène » viscéral.

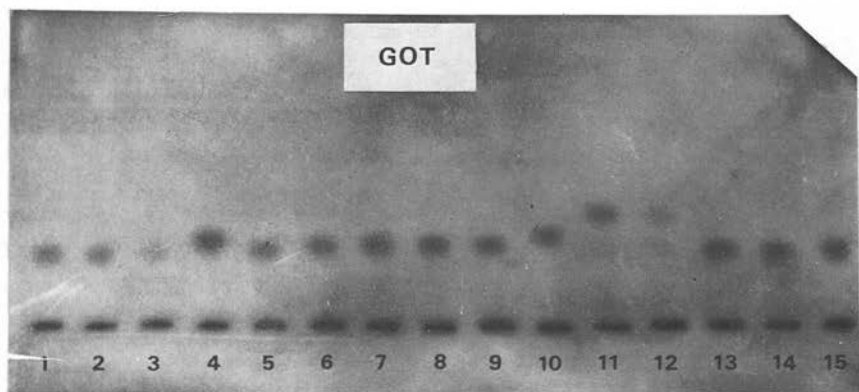
Au surplus, nos observations plaident en faveur de l'unicité de la leishmaniose viscérale circumméditerranéenne (1). Une telle situation peut s'expliquer *pro parte*, par les importants brassages de populations, traditionnels dans cette partie du monde. Il n'est pas jusqu'aux formes viscérales du Nouveau Monde qui ne seraient, elles aussi, d'origine méditerranéenne comme le suggèrent les récentes expériences d'infestation réalisées avec *Lutzomyia longipalpis* (R. Killick-Kendrick et coll., 1980), vecteur habituel de la leishmaniose systémique latino-américaine (*Leishmania chagasi* Cunha et Chagas, 1937).

En définitive les résultats obtenus permettent de désigner sans ambiguïté l'agent responsable des leishmanioses viscérales méditerranéennes par le binôme *Leishmania infantum* Nicolle, 1908.

(1) Ainsi se trouve validée l'hypothèse uniciste, avancée par plusieurs auteurs (J. Ranque et coll., 1962 ; J. Sirol et J. Vedy, 1972 ; R. E. Abdalla et coll., 1975). Toutefois, et sans pour autant remettre en question le principe de l'unicité, on ne peut formellement exclure l'existence d'un certain polymorphisme « intrafocal ». L'utilisation de techniques de migration plus performantes pourrait fort bien le faire apparaître sous forme de variants enzymatiques comme on en observe dans certains foyers de trypanosomes de l'Est-africain (A. Tait, 1980). Il n'est pas nécessaire de souligner l'intérêt de telles recherches, tant au plan génécologique (preuve de la reproduction sexuée et intervention de la sélection) qu'épidémiologique (existence de souches atténuées à pouvoir protecteur).



a



b

Fig. 2. Mobilités électrophorétiques pour les systèmes Phosphoglucose isomérase (a) et Glutamate oxaloacétate transaminase (b)

1: LEM 48 = *L. infantum* (Chien, Cévennes); 2: LEM 75 = *L. infantum* (enfant, Cévennes); 3: LEM 134 = *L. major* (adulte, U.R.S.S.); 4: LEM 138 = *L. donovani* (adulte, Inde); 5: LEM 42 = *L. infantum* (cutanéomuqueuse adulte, Cévennes); 6: LEM 77 = *L. infantum* (Chien, Tunisie); 7: LEM 35 = *L. infantum* (Chien, Cévennes); 8: LEM 74 = *L. chagasi* (enfant, Honduras); 9: LEM 51 = *L. infantum* (adulte, Cévennes); 10: LEM 82 = *L. donovani* spp. (enfant, Irak); 11: LEM 135 = *L. tropica* (adulte, Irak); 12: LEM 84 = *L. tropica* (Rat noir, Irak); 13: LEM 96 = *L. infantum* (Chien, Côte d'Azur); 14: LEM 53 = *L. infantum* (Chien, Cévennes); 15: LEM 41 = *L. infantum* (enfant, Cévennes).

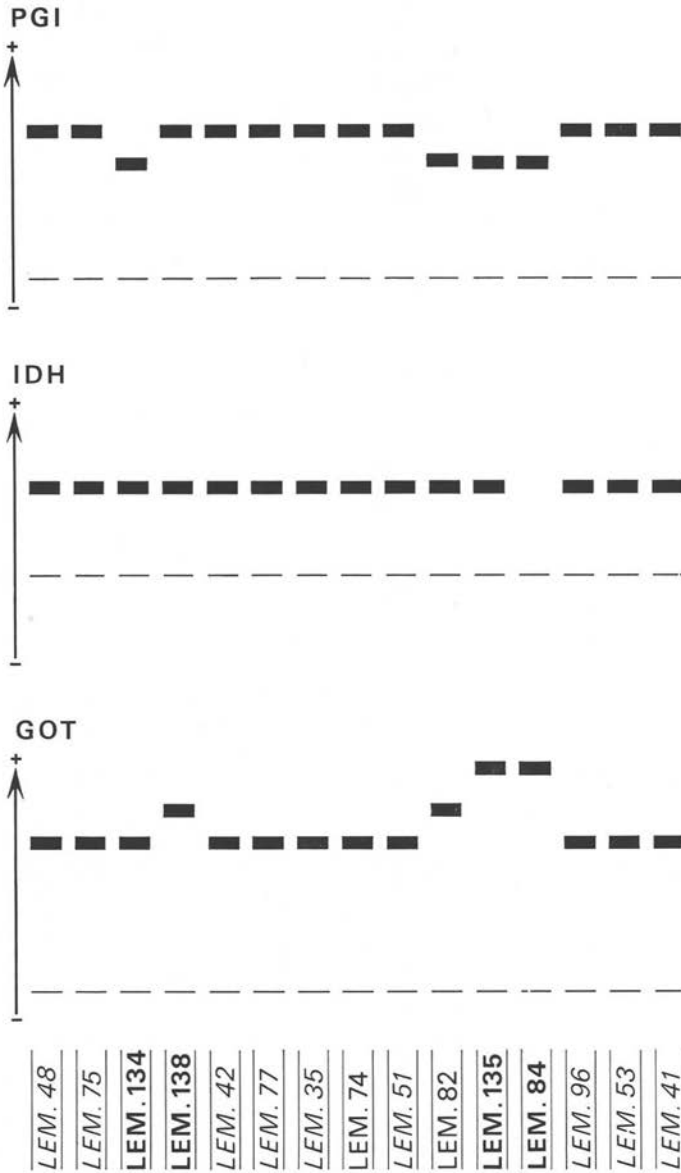


Fig. 3 a

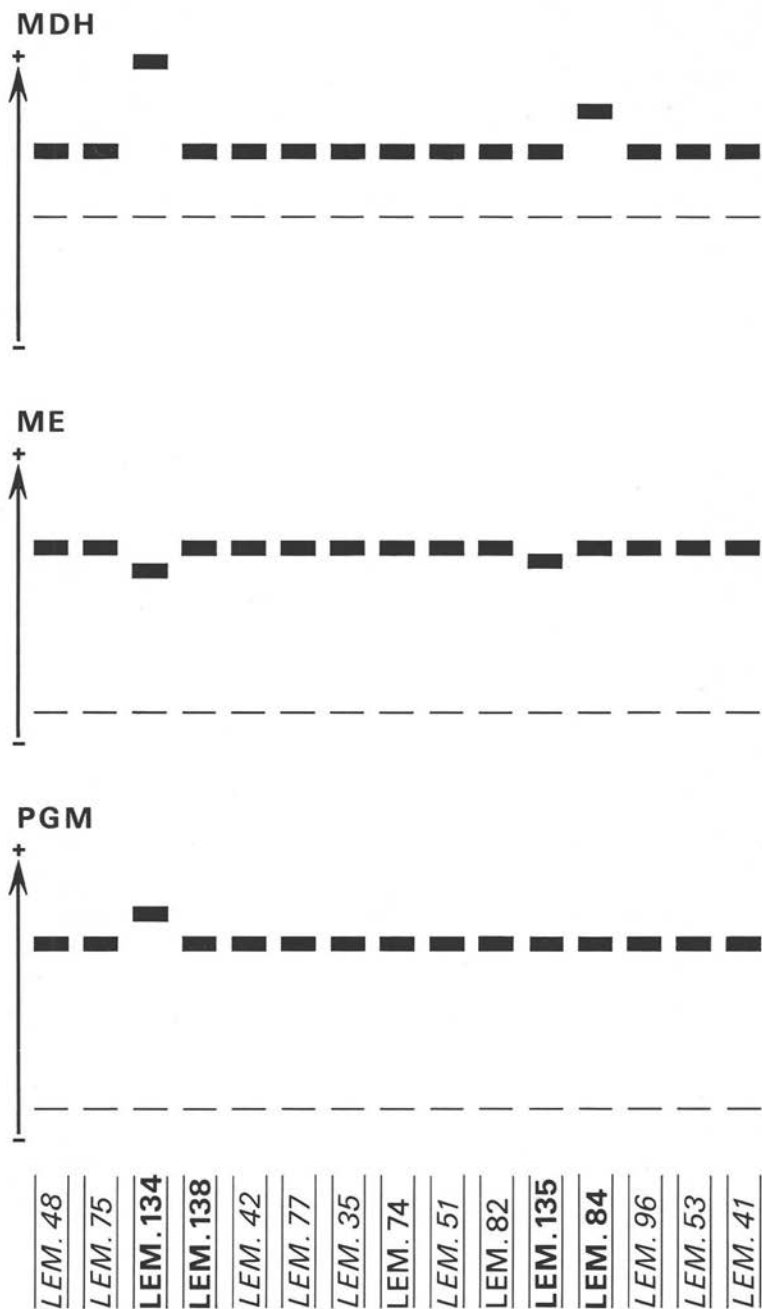


Fig. 3 b

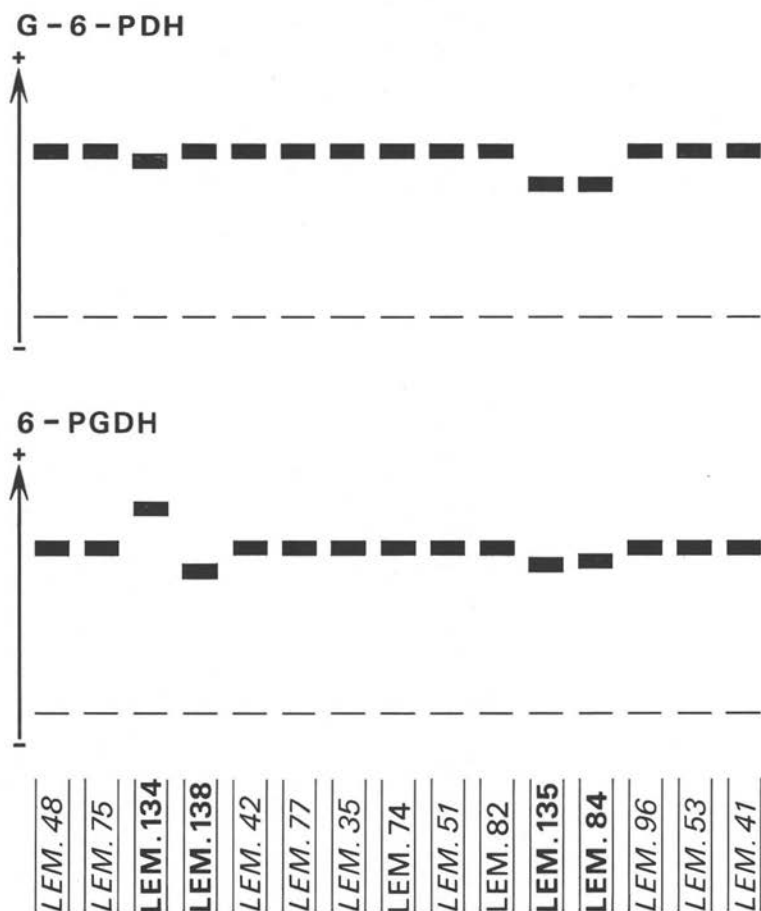


Fig. 3 c

Fig. 3 a, b et c. Représentation schématique de la mobilité électrophorétique des systèmes enzymatiques : Phosphoglucose isomérase, Isocitrate déshydrogénase et Glutamate oxaloacétate transaminase (3 a). Malate déshydrogénase, Enzyme malique et Phosphoglucomutase (3 b). Glucose-6-Phosphate déshydrogénase et 6-Phosphogluconate déshydrogénase (3 c). (Les indications en caractères gras correspondent aux souches de références. Origine des souches : cf. légende fig. 2).

REMERCIEMENTS. — Nous adressons nos plus vifs remerciements à MM. W. Al Hashimi, R. W. Ashford, A. Chadli, M. Chance, R. Killick-Kendrick, Y. Le Fichoux, W. Peters et B. C. Walton qui ont bien voulu nous communiquer les souches de référence utilisées dans ce travail.

Bibliographie

- Abdalla R. E., El Hadi A., Ahmed M. A., El Hassan A. M. : Sudan mucosal leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1975, 69, 443-449.
- Adler S. : *Leishmania*. In : Advances in Parasitology, 2, Academic Press, New York, 1964, pp. 35-36.
- Adler S., Theodor O. : The behaviour of cultures of *L. tropica*, *L. infantum* et *L. braziliense* in the sandfly, *Phlebotomus papatasi*. *Nature*, 1927, 119, 48-49.
- Aljeboori T. I., Evans D. A. : *Leishmania* spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. I. Visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980 a, 74, 169-177.
- Aljeboori T. I., Evans D. A. : *Leishmania* spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. II. Cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1980 b, 74, 178-184.
- Al Taqi M., Evans D. A. : Characterization of *Leishmania* spp. from Kuwait by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 72, 56-65.
- Ashford R. W., Bray M. A., Hutchinson M. P., Bray R. S. : The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1973, 67, 568-601.
- Blanc G., Caminopetros J. : Sensibilité du Spermophile de Macédoine (*Citillus citillus*) au Kala-Azar méditerranéen. *C.R. Acad. Sci.*, 1930, 191, 800-802.
- Bloomfield M. M., Remington J. S. : Comparison of three strains of *Toxoplasma gondii* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Trop. Geogr. Med.*, 1970, 22, 367-370.
- Bradley D. J. : Genetic control of natural resistance to *Leishmania donovani*. *Nature*, 1974, 250, 353-354.
- Bray R. S., Bryceson A. D. M. : Cutaneous leishmaniasis of the guinea-pig. Action of sensitised lymphocytes on infected macrophages. *Lancet*, 1968, 2, 898-899.
- Bray R. S., Bryceson A. D. M. : Studies on immunology and serology of Leishmaniasis. VIII. The identity of strains of *Leishmania* from ethiopian diffuse cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1969, 63, 524-527.
- Carter R. : Enzyme variation in *Plasmodium berghei* and *Plasmodium vinckei*. *Parasitology*, 1973, 66, 297-307.
- Chance M. L. : DNA relationships in the genus *Leishmania*. In : Biochemistry of parasites and host-parasite relationships, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1976, pp. 229-234.
- Chance M. L., Gardener P. J., Peters W. : Biochemical taxonomy of *Leishmania* as an ecological tool. In : Ecologie des Leishmanioses, Colloques Int. C.N.R.S., 1977, n° 239, pp. 53-61.
- Chance M. L., Peters W., Griffiths H. W. : A comparative study of DNA in the genus *Leishmania*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1973, 67, 24-25.
- Chance M. L., Peters W., Shchory L. : Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observations on DNA. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1974, 68, 307-316.
- Chang S. L., Negherbon W. O. : Studies on haemoflagellates. III. The specificity of serological reactions of *Leishmania donovani*, *L. brasiliensis*, *L. tropica* and *T. cruzi*. *J. infect. Dis.*, 1947, 81, 209-227.
- Cristina G. di : Sulla possibilità di provocare la formazione di agglutinine e di ambocettore specifici nei conigli trattati con colture di *Leishmania* umana. *Pathologica*, 1911, 3, 399-400.
- Decker J. E., Daggett P. M. : A comparison of the composition of the excretion factors of two species of *Leishmania* : *L. donovani* and *L. mexicana*. *J. Protozool.*, 1974, 24 (suppl.), 429.
- Ebert F. : Charakterisierung von *Leishmania donovani* — Stämmen mit der Disk-Elektrophorese. *Z. Tropenmed. Parasit.*, 1973, 24, 517-524.
- Gardener P. J., Chance M. L., Peters W. : Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II. Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1974, 68, 317-325.

- Gardener P. J., Howells R. E. : Isoenzyme variation in leishmanial parasites. *J. Protozool.*, 1972, 19 (suppl.), 47.
- Garnham P. C. C., Lewis D. J. : Parasites of British Honduras with special reference to leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1959, 53, 12-40.
- Hertig M., Mc Connell E. : Experimental infection on Panamanian *Phlebotomus* Sandflies with *Leishmania*. *Expl. Parasit.*, 1963, 14, 92-106.
- Kellina O. I. : Differences of susceptibility of inbred mice of different strains to *Leishmania tropica major*. *Medskaya Parazit.*, 1973, 42, 279-285.
- Kilgour V., Gardener P. J., Godfrey D. G., Peters W. : Demonstration of electrophoretic variation of two amino-transferases in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1974, 68, 245-246.
- Kilgour V., Godfrey D. G. : Species-characteristic isoenzymes of two amino-transferases in Trypanosomes. *Nature*, 1973, 244, 69-70.
- Killick-Kendrick R. : Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. In : Biology of the kinetoplastida, 2. *Academic Press*, New York, 1979, pp. 395-460.
- Killick-Kendrick R., Leaney A. J., Ready P. D., Molyneux D. H. : *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 1977, 196, 105-115.
- Killick-Kendrick R., Molyneux D. H., Leaney A. J., Rioux J. A. : Aspects of the life-cycle of *Leishmania* in the sandfly. In : *Proc. 2th. Eur. Multicoll. Parasit.*, Trogir, 1975, pp. 89-95.
- Killick-Kendrick R., Molyneux D. H., Rioux J. A., Lanotte G., Leaney A. J. : Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1980, 74, 563-565.
- Lainson R., Shaw J. J. : Leishmaniasis in Brazil : V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1970, 64, 654-667.
- Lanotte G. : Le foyer de leishmaniose viscérale des Cévennes. Limites et structures. *Thèse de biologie humaine*, Montpellier, 1975, 356 p.
- Lanotte G., Rioux J.-A., Périères J., Vollhardt Y. : Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bioclinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1979, 54, 277-295.
- Lanotte G., Rioux J.-A., Pralong F. : Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 14. Les leishmanioses humaines en Cévennes. Analyse clinique et biologique des formes viscérales et muqueuses. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1980, 55, 635-643.
- Le Ray D., Afchain D., Capron A. : Contribution de la connaissance des antigènes de *Leishmania* à l'immunologie des Trypanosomatidae. In : Ecologie des leishmanioses. *Colloques Int. C.N.R.S.*, 1977, n° 259, pp. 63-73.
- Manukian I. A., Safyanova V. M. : Comparative study of ultrastructure of leptomonad forms of *Leishmania tropica* Wright, *L. donovani* Laveran et Mesnil, as well as leptomonads isolated from reptiles and sandflies. *Medskaya Parazit.*, 1968, 37, 319-323.
- Miles M. A., Povoia M. M., Souza A. A. de, Lainson R., Shaw J. J. : Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1979, 74, 243-252.
- Montalvo F., Reeves R. E. : Electrophoretic characterization of Amebal Glucose Phosphate Isomerases. *Expl. Parasit.*, 1968, 22, 129-136.
- Nicolle C. : Reproduction expérimentale du Kala-Azar chez le chien avec le virus humain. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1980, 4, 57-58.
- Nicolle C., Comte C. : Origine canine du Kala-Azar. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1908, 1, 299-301.
- Peters W., Chance M. L., Gardener P. J. : Biochemical taxonomy of Leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1973, 67, 428.
- Peters W., Chance M. L., Mutinga M. J., Ngoka J. M., Schnur L. F. : The identification of human and animal isolates of *Leishmania* from Kenya. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1977, 71, 501-502.
- Ranque J., Picard D., Depieds R., Roche R., Ranque M. : Leishmaniose laryngée autochtone à forme pseudotumorale. Note parasitologique et épidémiologique. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1962, 146, 82-86.

- Rassam M. B., Al Mudhaffar S. A., Chance M. L.: Isoenzyme characterization of *Leishmania* species from Iraq. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 1979, 73, 527-534.
- Rioux J.-A., Croset H., Aboulker J.-P., Papierok B.: Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 4. Infestation d'une population naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1972 a, 47, 325-330.
- Rioux J.-A., Golvan Y.-J., Croset H., Tour S., Houin R., Abonnenc E., Petitdidier M., Vollhardt Y., Dedet J.-P., Albaret J.-L., Lanotte G., Quilici M.: Epidémiologie des Leishmanioses dans le sud de la France. *Monographie I.N.S.E.R.M.*, 1969, 37, 223 p.
- Rioux J.-A., Goubert J.-R., Lanotte G., Roustan J., Marco A.: Un cas de Leishmaniose autochtone de la muqueuse nasale. *Cah. O.R.L.*, 1980, 15, 423-425.
- Rioux J.-A., Killick-Kendrick R., Leaney A. J., Turner D. P., Bailly M., Young C. J.: Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 12. Dispersion horizontale de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Expériences préliminaires. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1979, 54, 673-682.
- Rioux J.-A., Lanotte G., Croset H., Dedet J.-P.: Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 5. Pouvoir infestant comparé des diverses formes de Leishmaniose canine vis-à-vis de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1972 b, 47, 413-419.
- Rioux J.-A., Lanotte G., Dedet J.-P., Martini-Dumas A.: Utilisation du milieu « cœur-cerveau-sang de mouton » pour la culture en masse des formes promastigotes des Leishmanies. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1970, 45, 381-384.
- Rioux J.-A., Lanotte G., Périères J., Croset H.: Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 6. Première mention de l'infestation spontanée de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1973, 48, 519-522.
- Safyanova V. M., Aliev E. I.: Comparative study of biological characteristics of the causal agents of zoonotic and anthroponotic cutaneous leishmaniasis in the U.S.S.R. *Bull. Org. Mond. Santé*, 1973, 49, 499-506.
- Sargeant P. G., Williams J. E., Grene J. D.: The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 72, 519-521.
- Schnur L. F., Zuckerman A., Greenblatt C. L.: Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted *in vitro* and *in vivo*. *Israel J. Med. Sci.*, 1972, 8, 932-942.
- Schnur L. F., Zuckerman A., Greenblatt C. L.: The relationship between the clinical types and serotypes of *Leishmania*. *J. Protozool.*, 1973, 20 (suppl.), 534.
- Scorza J. V., Valera M., Scorza C. de, Carnevali M., Moreno E., Lugo-Hernandez A.: A new species of *Leishmania* parasite from the Venezuelan Andes region. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1979, 73, 293-298.
- Shaw J. J., Lainson R.: Leishmaniasis in Brazil: XI. Observations on the morphology of *Leishmania* of the *braziliensis* and *mexicana* complexes. *J. Trop. Med. Hyg.*, 1976, 79, 9-13.
- Simpson L.: The Leishmania-Leptomonad transformation of *Leishmania donovani*: nutritional requirements, respiration changes and antigenic changes. *J. Protozool.*, 1968, 15, 201-207.
- Simpson L., Hyman B.: Restriction enzyme analysis of *Leishmania tarentolae* kinetoplast DNA. In: Biochemistry of parasites and host-parasite relationships. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1976, pp. 219-224.
- Sirol J., Delprat J., Ferrus P.: Les maladies leishmaniennes. *Méd. Trop.*, 1974, 34, 73-77.
- Sirol J., Vedy J.: La « maladie leishmanienne » existe-t-elle? A propos de la première observation tchadienne d'un Kala-Azar dit soudanais. *Nouv. Presse méd.*, 1972, 1, 1337-1340.
- Tait A.: Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature*, 1980, 287, 536-538.
-