

SIGNIFICATION DU POLYMORPHISME ENZYMATIQUE CHEZ LES LEISHMANIES

A propos de trois souches hétérozygotes
de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908,
Leishmania cf. tarentolae Wenyon, 1921
et *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973.

R. MAAZOUN*, G. LANOTTE*, J.-A. RIOUX*, N. PASTEUR*,
R. KILLICK-KENDRICK** et F. PRATLONG*

Collaboration technique : A. Martini-Dumas

RÉSUMÉ. L'analyse isoenzymatique de 49 souches de Leishmanies [35 *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, 10 *Leishmania cf. tarentolae* Wenyon, 1921, 2 *Leishmania tropica* (Wright, 1903) et 2 *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973] a révélé l'existence de structures hétérozygotes pour trois d'entre elles. Sur huit systèmes enzymatiques éprouvés : (PGM, PGI, G-6-PDH, 6-PGDH, IDH, MDH, ME et GOT), trois d'entre eux se sont exprimés par deux (PGM) ou trois (PGI et 6-PGDH) taches sur les gels d'électrophorèse. Une souche de *L. infantum* (Chien, Cévennes) et une souche de *L. cf. tarentolae* [*Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843)] étaient hétérozygotes pour la PGI. Une souche de *L. aethiopica* (Homme, Éthiopie) était hétérozygote pour la PGI, la PGM et la 6-PGDH. Les images observées, comparables à celles obtenues avec les organismes eucaryotes à reproduction sexuée, permettent de suspecter, chez les Leishmanies, l'existence de structures diploïdes et de processus d'échanges génétiques.

Significance of enzymatic polymorphism in Leishmaniae — On three heterozygous stocks of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania cf. tarentolae* Wenyon, 1921 and *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford and Bray, 1973.

SUMMARY. The analysis of 8 isoenzymes (PGM, PGI, G-6-PDH, 6-PGDH, IDH, MDH, ME, GOT) of 49 stocks of leishmaniae [35 of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, 10 of *Leishmania cf. tarentolae* Wenyon, 1921, 2 of *Leishmania tropica* (Wright, 1903) and 2 of *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford and Bray, 1973] revealed heterozygous structures in three stocks. These structures were expressed by two (PGM) or three (PGI, 6-PGDH) spots on the electrophoretic gels. Two stocks were heterozygous for PGI alone [one of *L. infantum* from a dog in the Cévennes, France; one of presumed *Leishmania tarentolae* from *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) from P. O., France] and one was heterozygous for PGI, PGM and 6-PGDH (*L. aethiopica* from man in Ethiopia). The results are comparable to those seen in eukaryotic organism with sexual reproduction and suggest that leishmaniae have diploid structures and a process of genetic exchange.

* Laboratoire d'Écologie médicale et Pathologie parasitaire (Pr. J. A. Rioux), Faculté de Médecine rue Auguste Broussonnet, F 34000 Montpellier.

** Medical Research Council (External Staff), Department of Pure and Applied Biology, Imperial College, London Sw 7 2 AZ (England).

Accepté le 17 février 1981.

Depuis ces dix dernières années, les méthodes d'identification des Trypanosomatidae ont considérablement évolué. Aux classiques arguments morphologiques, épidémiologiques, biogéographiques et climatiques (C.A. Hoare, 1966 et 1972 ; R. Lainson et J. J. Shaw, 1979 ; R. Killick-Kendrick, 1979), s'est ajoutée une gamme très diversifiée de caractères biochimiques. Une nouvelle systématique a pris corps, s'appuyant pour la première fois sur des critères intrinsèques, critères que l'on sait indispensables à la caractérisation de tout organisme vivant. Toutefois, parmi les nouvelles techniques proposées, une seule est actuellement praticable par les laboratoires non spécialisés : l'analyse des *isoenzymes*. Son incontestable succès est lié à l'existence, chez les Kinetoplastida, d'un important polymorphisme qui s'exprime sous la forme de variants facilement révélés, comme autant d'électromorphes, par les techniques courantes. Les différents *électromorphes* de même activité catalytique (ou isoenzymes) peuvent être codés par un ou plusieurs gènes. L'analyse conjointe d'un nombre suffisant de systèmes enzymatiques, judicieusement choisis, permet de caractériser chaque souche par ses *zymogrammes*. Chez les Leishmanies, le mode de reproduction asexué garantit la stabilité des *zymogrammes* tant qu'aucune mutation n'intervient. Les souches et, *a fortiori*, les clones possédant les mêmes *zymogrammes* sont considérés comme appartenant à la même unité taxonomique élémentaire. Le concept de *zymodème* (D. G. Godfrey, 1979) s'applique précisément à ce type d'« unité ».

Toutefois, l'utilisation de ce concept à des fins systématiques, voire phylétiques réclame une certaine prudence, en raison des indications de plus en plus nombreuses suggérant l'existence d'une diploïdie, voire d'échanges génétiques. Ainsi, dans un article très documenté sur le sous-genre *Trypanozoon*, W. C. Gibson *et al.* (1980) présentent plusieurs illustrations évoquant, de manière troublante, les hétérozygotes observés chez les organismes eucaryotes diploïdes. Les deux types classiques d'électromorphes, à deux (monomères) ou trois (dimères) taches, y sont clairement figurés. Bien plus, en étudiant les isozymes de 17 souches sympatriques de *Trypanosoma brucei brucei*, A. Tait (1980) constate que les proportions d'homozygotes et d'hétérozygotes se répartissent selon la loi de Hardy-Weinberg. L'auteur conclut à l'existence de recombinaisons génétiques au sein d'une population mendélienne, c'est-à-dire diploïde et à reproduction sexuée.

Or, jusqu'à présent, malgré la qualité et le nombre des travaux réalisés (P. J. Gardener *et al.* 1973 et 1974 ; M. L. Chance et P. J. Gardener, 1975 ; M. Al-Taqi et D. A. Evans, 1978 ; M. B. Rassam *et al.*, 1979 ; T. I. Aljeboori et D. A. Evans, 1980 a et b ; J. A. Rioux *et al.*, 1980 ; R. Maazoun *et al.*, 1981) l'existence de structures « hétérozygotes » n'a pas été mentionnée chez les Leishmanies. C'est précisément de la réalité de telles structures, observées en France et en Éthiopie et de leur signification dont il est question dans le présent article.

Matériel et méthode

L'analyse a porté sur un total de 49 souches isolées (*tableau I*) de :

- 1) 34 cas de leishmaniose viscérale canine, originaires des Cévennes méridionales.

Ces souches ont été obtenues par ponction ganglionnaire, lors d'enquêtes systématiques (G. Lanotte *et al.*, 1979) ou d'examen vétérinaires à but diagnostique. Il s'agit dans tous les cas de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 ;

2) 9 cas de leishmaniose généralisée du Gecko *Tarentola mauritanica* (L., 1758), provenant des environs de Banyuls-sur-Mer (Pyrénées-Orientales). Les cultures sur NNN ont été obtenues par ponction cardiaque. Il s'agit de *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921¹. Dans le même site, une souche a été obtenue par culture du contenu intestinal de *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843), vecteur habituel du parasite ;

TABLEAU I. — Liste des souches étudiées pour les huit systèmes enzymatiques : PGM, PGI, G-6-PDH, 6-PGDH, IDH, MDH, ME et GOT. Sur 49 souches, seules 3 d'entre elles (LEM 47, LEM 87 et LEM 109) présentent une ou plusieurs structures hétérozygotes.

N° de référence	Taxon	Hôte (Détermination clinique)	Origine géographique
LEM 75	<i>Leishmania infantum</i>	Enfant (leishmaniose viscérale)	France (Cévennes)
LEM 35, 47, 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	<i>Leishmania infantum</i>	Chien (leishmaniose viscérale)	France (Cévennes)
LEM 112, 113, 115, 116, 117, 119, 120, 123, 124	<i>Leishmania tarentolae</i>	<i>Tarentola mauritanica</i> (leishmaniose générale)	France (Pyrénées- Orientales)
LEM 87	<i>Leishmania</i> cf. <i>tarentolae</i>	<i>Sergentomyia minuta</i> (localisation digestive)	France (Pyrénées- Orientales)
LEM 109, 144	<i>Leishmania aethiopica</i>	Homme (leishmaniose cutanée)	Éthiopie
LEM 143	<i>Leishmania tropica</i>	Homme (leishmaniose cutanée)	Éthiopie
LEM 141	<i>Leishmania tropica</i>	Chien (leishmaniose cutanée)	Inde

1. Cette espèce a été signalée pour la première fois en France à Banyuls-sur-Mer, dans les Pyrénées-Orientales (J. A. Rroux et coll., 1969) puis retrouvée dans la même localité dix ans plus tard (J. A. Rroux et coll., 1979).

- 3) 2 cas de leishmaniose cutanée humaine à *Leishmania ethioplastica* Bray, Ashford et Bray, 1973, originaires d'Éthiopie.
 4) 2 cas de leishmaniose cutanée à *Leishmania tropica* (Wright, 1903), dont un humain d'origine éthiopienne, l'autre canin d'origine indienne.
 5) 1 cas de leishmaniose infantile autochtone (Cévennes) à *Leishmania infantum* Nicolle, 1908. Cette souche (LEM 75) a servi de référence.

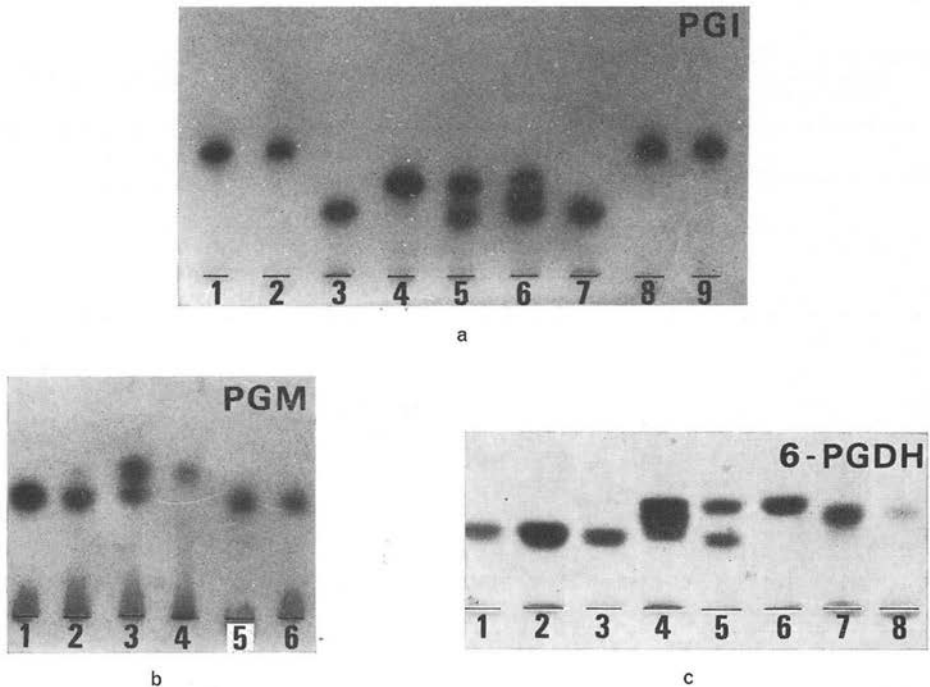


FIG. 1.

- a) PGI : Phosphoglucose isomérase. Électrophorèse en gel épais. 1, 2, 8 et 9 : *L. infantum* (LEM 75, LEM 104, LEM 103 et LEM 102). 3 et 7 : *L. tropica* (LEM 143 et LEM 141). 4 et 6 : *L. ethioplastica* (LEM 144 et LEM 109). 5 : *L. tropica* (LEM 143) et *L. ethioplastica* (LEM 144). Pour *L. ethioplastica* (LEM 109), l'activité enzymatique se traduit par un zymogramme à trois bandes régulièrement espacées, la médiane la plus intense (6). Dans le cas particulier (système dimérique), cette image est caractéristique d'une structure hétérozygote. Le mélange extemporané (5) de *L. tropica* (LEM 143) et *L. ethioplastica* (LEM 144) se traduit par l'addition des bandes propres à chaque zymodème : aucun échange ne s'est produit.
- b) PGM : Phosphoglucomutase. Électrophorèse en gel épais. 1, 2, 5 et 6 : *L. tropica* (LEM 143). 3 et 4 : *L. ethioplastica* (LEM 109 et LEM 144). Pour *L. ethioplastica*, hétérozygote (LEM 109), la Phosphoglucomutase, monomérique, s'exprime par un zymogramme à deux bandes.
- c) 6-PGDH : 6-Phosphogluconate déshydrogénase. Électrophorèse en gel épais. 1 et 2 : *L. infantum* (LEM 102 et LEM 104). 3 : *L. tropica* (LEM 143). 4 et 6 : *L. ethioplastica* (LEM 109 et LEM 144). 5 : mélange extemporané de *L. tropica* (LEM 143) et *L. ethioplastica* (LEM 144). Pour *L. ethioplastica* hétérozygote (LEM 109), la 6-Phosphogluconate déshydrogénase, dimérique comme la Phosphoglucose isomérase, présente un zymogramme à trois bandes (4). Le mélange extemporané (5) des extraits de *L. tropica* (LEM 143) et *L. ethioplastica* (LEM 144) monomorphes (3 et 6), se traduit par la simple addition des bandes respectives des deux souches.

Les extraits sont préparés selon la technique décrite par R. Maazoun *et al.* (1981). L'électrophorèse est réalisée en gel d'amidon épais (1 cm) et mince (0,1 cm) à partir d'échantillons conservés dans l'azote liquide sous forme de perles de 200 μ l. 8 systèmes enzymatiques sont étudiés :

- la Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1.
- la Phosphoglucose isomérase (PGI) E.C.5.3.1.9.
- la Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) E.C.1.1.1.49.
- la 6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44.
- l'Isocitrate déshydrogénase (IDH) E.C.1.1.1.42.
- la Malate déshydrogénase (MDH) E.C.1.1.1.37.
- l'Enzyme malique ou décarboxylase (ME) E.C.1.1.1.40.
- la Glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) E.C.2.6.1.1.

Résultats et commentaires

Sur les 8 systèmes éprouvés (*tableau II*), *Leishmania infantum* (souche canine d'origine cévenole, LEM 47) et *Leishmania cf. tarentolae* (souche isolée de *Sergentomyia minuta*, Pyrénées-Orientales, LEM 87) révèlent une structure hétérozygote pour un seul d'entre eux, la Phosphoglucose isomérase (PGI). Trois bandes régulièrement espacées, la médiane la plus intense, témoignent de la présence d'une protéine dimère (*fig. 1 et 2, tableau II*). *Leishmania aethiopica* (LEM 109) possède au moins 3 systèmes hétérozygotes (*tableau II*) : la Phosphoglucose isomérase (PGI) et la 6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH), toutes deux dimériques, s'expriment par trois bandes ; la Phosphoglucomutase (PGM), monomérique, n'offre que deux bandes (*fig. 3*).

TABLEAU II. — Fréquence du polymorphisme chez les 3 souches hétérozygotes de *Leishmania infantum* (LEM 47), *Leishmania cf. tarentolae* (LEM 87) et *Leishmania aethiopica* (LEM 109).

N° de Référence	Systèmes hétérozygotes	Fréquence de l'hétérozygotie
LEM 47	Phosphoglucose isomérase (PGI)	1/8
LEM 87	Phosphoglucose isomérase (PGI)	1/8
LEM 109	Phosphoglucomutase (PGM) Phosphoglucose isomérase (PGI) 6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH)	3/8

Au surplus, le mélange extemporané des extraits de deux souches (LEM 143 et LEM 144 : leishmanioses cutanées d'origine éthiopienne) donne un zymogramme

correspondant à la simple juxtaposition de leurs bandes respectives (fig. 2) ; autrement dit, ce zymogramme diffère de celui de *Leishmania ethiopica* hétérozygote (LEM 109) par l'absence de bande médiane.

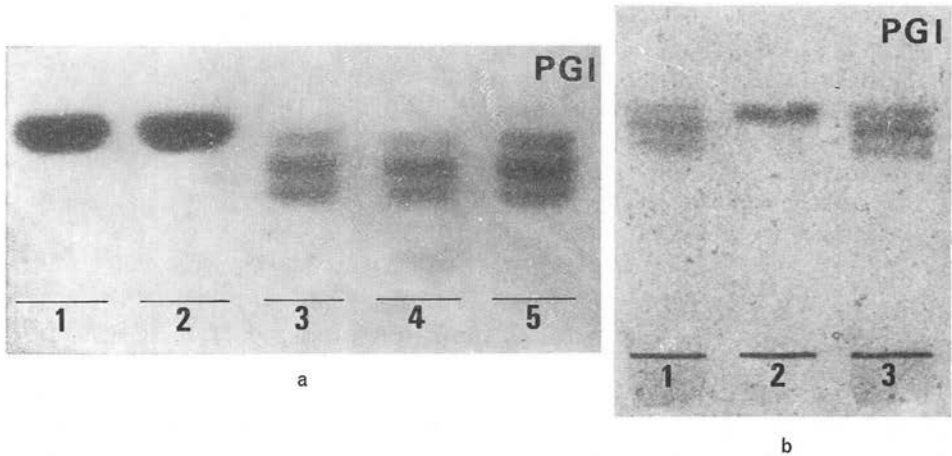


FIG. 2. — PGI : Phosphoglucose isomérase. Électrophorèse en gel mince. a) 1 et 2 : *L. tropica* (LEM 141 et LEM 143). 3, 4 et 5 : *L. ethiopica* (LEM 109); b) 1 et 3 : *L. cf. tarentolae* (LEM 87). 2 : *L. tarentolae* (LEM 119). Pour cette enzyme, dimérique, *L. ethiopica* (LEM 109) et *L. cf. tarentolae* (LEM 87) présentent trois bandes (a 3, 4 et 5; b 1 et 3) caractéristiques d'une structure hétérozygote. Les souches homozygotes (a 1 et 2; b 2) ne s'expriment que par une seule tache.

*
* *

Au demeurant, si l'analyse enzymatique suggère l'existence de structures hétérozygotes comparables à celles des eucaryotes diploïdes, leur signification et les mécanismes de production restent, pour l'instant, du domaine des hypothèses :

1) A partir d'un matériel habituellement haploïde, on peut concevoir un processus de *duplication génique suivi de mutation* : deux gènes d'un même système enzymatique, situés sur le même chromosome, coderaient donc pour deux allozymes différentes. Dans cette éventualité, la plupart des gènes existeraient à un seul exemplaire dans chaque individu et leur produit apparaîtrait sous la forme d'une tache unique sur les gels d'électrophorèse. Quelques gènes dupliqués pourraient, alors, produire des zymogrammes typiques d'hétérozygotes diploïdes.

2) On peut également imaginer la production de variants enzymatiques par « *mutations somatiques* » au sein de dèmes diploïdes, mais asexués.

3) En fait, le nombre important de gènes hétérozygotes, souvent observés dans une même souche, l'équilibre statistique de phénotypes enzymatiques, constaté dans certaines populations de Trypanosomes (A. Tait, *loc. cit.*), l'obtention expérimentale de souches intermédiaires par infestation mixte des vecteurs (V. M. Safyanova et A. N. Alexeiev, 1977) constituent autant d'arguments en faveur d'une *diploïdie* et d'un processus de *multiplication sexuée*.

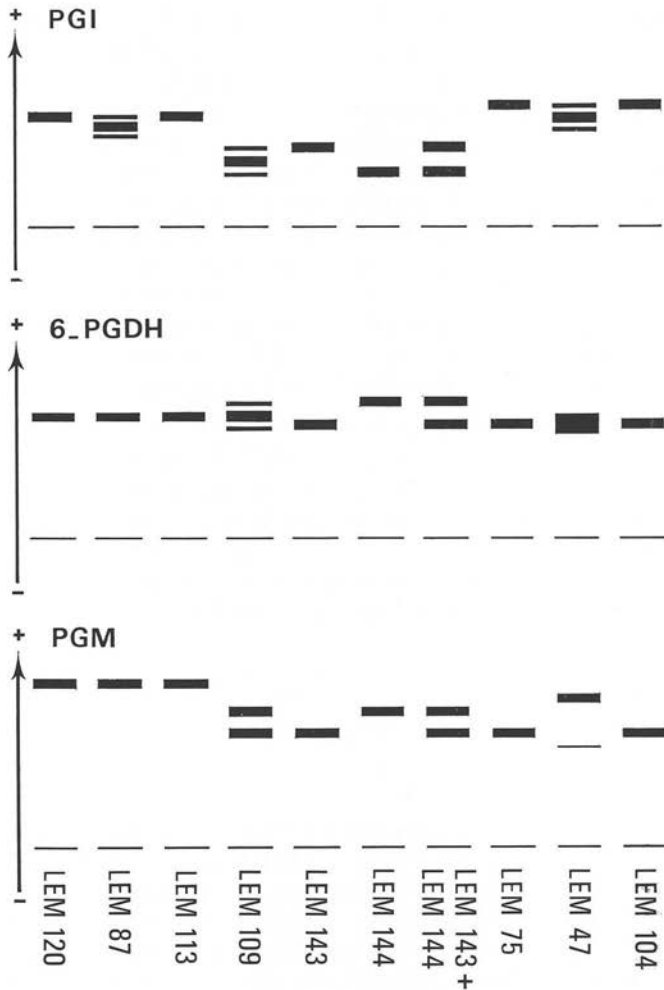


FIG. 3. — *Leishmania cf. tarentolae* (LEM 87) présente une structure hétérozygote pour la PGI. *L. ethiopica* (LEM 109) présente une telle structure pour la PGI (dimère), la 6-PGDH (dimère) et la PGM (monomère). *L. infantum* (LEM 47) présente une structure hétérozygote nette pour la PGI. Une épaisseur inhabituelle de la bande 6-PGDH traduit peut-être, une structure hétérozygote. Le mélange extemporané des deux souches monomorphes *L. ethiopica* (LEM 144) et *L. tropica* (LEM 143) ne donne que deux bandes pour la PGI et la 6-PGDH : aucun processus d'hybridation ne s'est produit *in vitro*.

Toutefois, dans cette hypothèse, il reste à rendre compte de la grande proportion de loci homozygotes observée dans la plupart des cas. Remarquons cependant que de telles dispositions, quoique rares, se rencontrent chez les organismes diploïdes à reproduction strictement sexuée (Rongeurs du genre *Dipodomys*, W. E. Johnson et R. K. Selander, 1971) et il n'est pas impossible que les Trypanosomatidae dont l'originalité physiologique est déjà très grande, appartiennent à ce groupe d'organismes. La basse fréquence du polymorphisme pourrait également être le résultat d'une forte pression de sélection exercée par les divers hôtes sur des populations parasites à taux de renouvellement élevé (P. J. Générmont, 1980). On ne peut enfin éliminer le biais introduit par les épidémiologistes dans l'échantillonnage des souches : les isolats les plus nombreux proviennent actuellement de l'Homme ou des Mammifères commensaux, alors que les processus sexués pourraient se dérouler ailleurs, chez les vecteurs (R. Killick-Kendrick, 1979) voire chez les Vertébrés sauvages. Dans cette dernière éventualité, le monomorphisme enzymatique pourrait être induit par les « hôtes secondaires » (*sensu* P.C.C. Garnham, 1965) et, par conséquent, s'observerait essentiellement dans les cycles artificialisés.

En toute logique, si l'existence de la sexualité était confirmée, le concept de zymodème devrait être étendu au complexe des phénotypes issus d'une même population mendélienne, c'est-à-dire, à un ensemble de zymogrammes différents. Cependant, en raison du monomorphisme habituel des souches isolées, l'acception initiale pourrait être provisoirement maintenue. Le zymodème continuerait ainsi à servir d'« unité opérationnelle » dans les travaux de taxonomie numérique qui, rappelons-le, ne font appel à aucune hypothèse biologique.

*
* *

Quoi qu'il en soit, les considérations théoriques, développées à l'occasion de ce travail, renforcent singulièrement l'intérêt porté par les écologistes à la connaissance biochimique des Trypanosomatidae. Ainsi, l'analyse enzymatique des Leishmanies, réalisée sur des « populations de souches », et dans le double esprit, génétique et épidémiologique, devrait conduire à une meilleure connaissance des phénomènes de reproduction et de circulation des parasites dans les réservoirs et les vecteurs. L'approche « systémique », structurale et fonctionnelle, des foyers leishmaniens en bénéficierait largement.

REMERCIEMENTS. Nos plus vifs remerciements vont à Messieurs R. W. Ashford, R. S. Bray, M. L. Chance, J. David, P. C. C. Garnham, P. J. Générmont, D. G. Godfrey et W. Peters qui nous ont très aimablement communiqué certaines souches et nous ont fait largement profiter de leur expérience.

BIBLIOGRAPHIE

- 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, 178-187.
- 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.
- CHANCE M. L., GARDENER P. J. : Biochemical and morphological differentiation within the genus *Leishmania*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 69, 9.
- CHANCE M. L., SCHNUR L. F., THOMAS S. C. : The identity of African rodent leishmanias. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1977, 71, 113.
- EVANS D. A. : Kinetoplastida. In : Methods of cultivating parasites *in vitro*. *Acad. Press*, 1978, 55-88.
- GARDENER P. J., CHANCE M. L., PETERS W. : Isoenzyme variation between life-cycle stages of *Leishmania*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1973, 67, 23.
- 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.
- GARNHAM P. C. C. : The Leishmanias, with special reference to the role of animal reservoirs. *Am. Zoologist*, 1965, 5, 141-151.
- GÉNÉRMONT P. J. : Les animaux à reproduction uniparentale. In : Les problèmes de l'espèce dans le règne animal. *Soc. zool. Fr. Ed.*, 1980, 3, 287-320.
- GIBSON W. C., MARSHALL DE C. T. F., GODFREY D. G. : Numerical analysis of enzyme polymorphism : A new approach to the epidemiology and taxonomy of Trypanosomes of the subgenus *Trypanozoon*. In : Advances in Parasitology, *Acad. Press*, 1980, 18, 176-246.
- GODFREY D. G. : The zymodemes of Trypanosomes. *Symp. Br. Soc. Parasit.*, 1979, 17, 31-53.
- HOARE C. A. : The classification of mammalian Trypanosomes. *Ergebn. Mikrobiol. Immunforsch. Exper. Ther.*, 1966, 43-57.
- HOARE C. A. : The Trypanosomes of Mammals. *Blackwell Sc. Pub.*, 1972, 749 p.
- JOHNSON W. E., SELANDER R. K. : Protein variation and systematics in Kangaroo Rats (*genus : Dipodomys*). *Systematic Zoology*, 1971, 20, 377-405.
- KILLICK-KENDRICK R. : Biology of *Leishmania* in Phlebotomine sandflies. In : Biology of the Kinetoplastida, *Acad. Press*, 1979, 2, 395-460.
- LAINSON R., SHAW J. J. : The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In : Biology of the Kinetoplastida, *Acad. Press*, 1979, 2, 1-116.
- LANOTTE G., RIOUX J. A., PÉRIÈRES J., VOLLHARDT Y. : Écologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Élaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1979, 54, 277-295.
- MAAZOUN R., LANOTTE G., PASTEUR N., RIOUX J. A., KENNOU M. F., PRATLONG F. : 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. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1981, 56, 131-146.
- MAYR E. : Population, espèces et évolution. *Herman*, 1974, 496 p.
- 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.
- READY P. D., MILES M. A. : Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1979, 74, 238-241.
- RIOUX J. A., KILLICK-KENDRICK R., GARNHAM P. C. C. : *Leishmania tarentolae* and other blood parasites of geckoes in the south of France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1979, 73, 319.
- RIOUX J. A., KNOEPFLER L. P., MARTINI A. : Présence en France de *Leishmania tarentolae* Wenyon, 1921, parasite du Gecko *Tarentola mauritanica* (L. 1758). *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 1969, 44, 115-116.
- RIOUX J. A., LANOTTE G., MAAZOUN R., PERELLO R., PRATLONG F. : *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1980, 291, 701-703.
- SAFYANOVA V. M., ALEXEIEV A. N. : Mixed experimental infection of *Phlebotomus papatasi* (Sc.) with different species of *Leishmania*. In : Écologie des Leishmanioses. *Colloques int. C.N.R.S.*, 1977, n° 239, 153-156.
- TAIT A. : Evidence for diploidy and mating in Trypanosomes. *Nature*, 1980, 287, 536-538.